



université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie marine

École Doctorale des sciences de la mer

présentée par

Claire Galland

Préparée à l'Unité Mixte de Recherche 6539

CNRS/UBO/IRD/Ifremer

Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin

Institut Européen de la Mer

Réponses du Flet européen *Platichthys flesus* à la contamination chimique : approche protéomique

Thèse soutenue le 17 décembre 2012

devant le jury composé de :

Pascal SOURDAINE

Professeur, Université de Caen Basse-Normandie / rapporteur

Franck LEFOLL

Professeur, Université du Havre / rapporteur

Wilfried SANCHEZ

Chargé de recherche, INERIS / examinateur

Vianney PICHEREAU

Professeur, Université de Bretagne occidentale / examinateur

Michel AUFFRET

Professeur, Université de Bretagne occidentale / examinateur

Louis QUINIOU

Ingénieur de recherche, Université de Bretagne occidentale /
Directeur de thèse



Ce travail a bénéficié du soutien financier du programme européen INTERREG IV-DIESE (Détermination d'Indicateurs Environnementaux pertinents : Une Stratégie pour l'Europe), de l'ONEMA (Office nationale de l'eau et des milieux aquatiques), ainsi que des programmes suivants : INERIS-DEVIL et ANR EVOLFISH.

Un jour, dit la légende, il y eut un immense incendie de forêt. Tous les animaux terrifiés, atterrés, observaient impuissants le désastre. Seul le petit colibri s'activait, allant chercher quelques gouttes avec son bec pour les jeter sur le feu. Après un moment, le tatou, agacé par cette agitation dérisoire, lui dit : «Colibri! Tu n'es pas fou ? Ce n'est pas avec ces gouttes d'eau que tu vas éteindre le feu ! »

Et le colibri lui répondit : « Je le sais, mais je fais ma part. »

Légende africaine

Remerciements

“Maggie: Thought, you might be interested in training me.
Frankie: I don’t train girls
Maggie: Maybe you should. People see me fight say I’m pretty tough.
Frankie: Girlie, tough ain’t enough”

Clint Eastwood (Million dollar baby)

« N'oublie pas
Cette pluie sage et heureuse
Sur ton visage heureux
Sur cette ville heureuse
Cette pluie sur la mer »

J. Prévert

« Bloup bloup...bloup » flet DK025

Je tiens à remercier la direction du LEMAR, Laurent Memery et Vianney Pichereau, ainsi que Fabienne Guérard qui m’ont donné une chance en me permettant de travailler sur ce sujet. Merci également à Jean Laroche de m’avoir intégrée dans son équipe, d’avoir partagé sa connaissance encyclopédique de la bibliographie et pour les discussions sur le flet.

Je tiens également à remercier Frank Lefoll et Pascal Sourdain qui ont accepté d’être rapporteurs de ce travail ainsi que Wilfried Sanchez et tous les membres du jury. Merci pour vos commentaires qui m’ont aidée à améliorer ce manuscrit.

J’adresse toute ma reconnaissance à Louis Quiniou, qui a accepté de devenir mon directeur de thèse. Louis est au laboratoire ce que le tubiste est à l’orchestre : sans jouer les premiers rôles ni se mettre en avant par des envolées virtuoses, les basses assurent l’équilibre de chaque accord, même en cas de renversements, et sont indispensables. Merci à toi d’avoir partagé avec moi ta passion des poissons, de la mer, des bateaux et de la pêche.

Je ne serais arrivée à rien sans l’aide de Vianney Pichereau. Merci de m’avoir initiée à l’art de la protéomique comme à beaucoup d’autres, de m’avoir guidée et encouragée tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier Michel Auffret pour son aide et ses conseils en cytométrie en flux, pour son soutien tout au long de la thèse et les discussions en écotoxicologie.

Ce projet a été financé par l’Union Européenne dans le cadre du projet Interreg IV Transmanche DIESE. Je tiens donc à remercier Christophe Minier, coordinateur de ce projet,

ainsi que Christian Dang pour l'organisation, ainsi que tous les partenaires du projet pour les discussions constructives et les bons moments passés à chacune de nos rencontres.

J'ai eu la chance de collaborer au cours de ces années avec de nombreuses personnes dans le cadre du projet ANR Evolfish. Je remercie donc Jean Laroche, Isabelle Calves, Guy Claireaux, Aline Amerand, Michael Theron et Nicolas le Bayon de m'avoir intégrée dans leur projet.

Ce travail a également bénéficié de la contribution de nombreuses personnes : merci à Alain Devaux pour les tests comète, à Véronique Loizeau pour les dosages de PCB et les discussions « chimie », à Claire Quentel pour l'élevage des poissons à l'ANSES et les conseils sur la mesure de l'immunotoxicité, à Wilfried Sanchez pour les mesures d'activités enzymatiques anti-oxydantes, Mehdi Taiya pour la gestion de la plateforme de spectrométrie de masse, à Mailys Labonne et Jean-Marie Munaron à l'IRD. Merci également aux pêcheurs rencontrés au cours des échantillonnages, ainsi qu'à Rachid Amara, Christophe Minier et Bill Langston pour leur accueil dans leur laboratoire respectif pour la dissection des poissons.

Je tiens également à saluer toutes les personnes que j'ai côtoyées quotidiennement et qui d'une façon ou d'une autre, m'ont facilité le travail et ont rendu ces années plus agréables grâce leur aide, leurs conseils ou par un simple sourire au détour d'un couloir : les membres du LEMAR et plus particulièrement Nelly Le Goïc, Philippe Soudant, Caroline Fabioux, Christophe Lambert, Christian Hily, Jacques Grall, Alain Marhic, Anne Donval mais aussi Gene, Anne-So, Maryline et Agnès au secrétariat, Bob et Monique Briand, Alain Lemercier et les autres membres du service informatique. Un merci particulier à Olivier, qui m'a fait découvrir le hockey sur glace et avec qui parler statistiques devient un plaisir, ainsi que tous mes autres collègues de bureau. Merci également à Yannick, Sophie et Pascal à l'accueil pour les discussions matinales autour de la qPCR et à Elisabeth Bondu de l'école doctorale (gratouille à Haribo, le petit chat)...

Merci également aux autres doctorants qui m'ont précédée dans le laboratoire : Edouard, Isabelle, Aurélie, Rossana, Aurore Gorlas, Maud, Yohann, Caroline Nerot, Morgane Lejard...

Ces deux dernières années, j'ai eu le plaisir de donner des cours en licence dans le cadre du monitorat. Merci à Marie-Anne Bessieres, Stella Roy, Eric Quemener, Ali, Nolwenn Hymery, Claude, Julia et Aurore, Aline Amerand pour les bons moments passés en TP de biologie cellulaire et de biochimie.

Au cours de cette thèse, j'ai pu participer à de nombreuses activités de diffusion scientifiques. Merci aux membres de l'association Merscidoc, Manu, Catherine, Amadou, Aurore, Marion, Guillaume et vénérable Tocard.... Merci également à Bertrand Gobert et Cécile Nassalang de m'avoir fait profiter de leur expérience et de m'avoir permis de participer à tant d'activités.

Ce travail m'a également permis de rencontrer des gens qui sont aujourd'hui devenus mes amis :

Ma chum Célie, ma sœur jumelle née sous le signe du poisson. Merci pour ton indéfectible optimisme, pour ta patience, ton sourire, tes expressions québécoises fleuries. Merci de m'avoir aidée à comprendre ces problèmes d'écologie et de m'avoir initiée à la génétique des populations.

Carole, ma petite fée des labo, qui a exaucé tant de vœux d'un coup de pipette magique. Merci pour ton dynamisme et pour ton soutien.

Mes compagnons de « galère », Claire (l'autre), Anne-Cécile et Virginie. Merci d'avoir toujours répondu présentes, pour vos blagounettes et pour votre soutien.

Merci également aux jeunes padawan, Nicolas et Romain, qui ont été des stagiaires plein de mérite et prennent aujourd'hui la relève. Que la force soit avec vous.

Merci à Morgana pour son amitié, pour m'avoir fait découvrir l'Italie, la plongée, les « bêtes » de l'estran, les lapins crétins et la salsa.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, Nelly (et Zebullon, qui va bientôt montrer le bout de son nez, se faire un « vrai » prénom et pourra toujours compter sur sa tata qui pique), Nicolas, mes parents, Isabelle et les autres qui, malgré l'éloignement, m'ont soutenu tout au long de ces années et ont même relu certains passages de ce manuscrit.

« C'est en allant vers la mer que le fleuve reste fidèle à sa source » J. Jaurès

Liste des communications scientifiques

Publications dans des revues à comités de lecture internationales :

C. Galland, C. Dupuy, V. Loizeau, M. Danion, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau. En revue après corrections mineures. Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to experimental PAH-PCB contamination. *Marine Pollution Bulletin*

IF₂₀₁₃ : 2,7

C. Dupuy, **C. Galland**, W. Sanchez, R. Riso, M. Waeles, V. Pichereau, M. Fournier, L. Quiniou, J. Laroche. In press. Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Marine Pollution Bulletin*

IF₂₀₁₃ : 2,7

C. Dupuy, **C. Galland**, A. Devaux, S. Bony, V. Loizeau, M. Danion, V. Pichereau, M. Fournier, J. Laroche, 2014. Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions. *Environmental Science and Pollution Research*. 21: 13789-13803. DOI : 10.1007/s11356-014-2563-y

IF₂₀₁₃ : 2,75

C. Galland, C. Dupuy, C. Capitaine, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau, 2013. Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *Journal of sea research*. 75: 135-141. DOI:10.1016/j.scares.2012.05.009

IF₂₀₁₃ : 1.85

Communications orales en congrès internationaux (auteur ayant effectué la présentation):

C. Galland, C. Dupuy, L. Quiniou, M. Auffret, L. Laroche, V. Pichereau. 2012 Response of the European flounder *Platichthys flesus* to experimental and in situ contaminations: A proteomic approach. *28th Congress of the New European-Society-for-Comparative-Physiology-and-Biochemistry (ESCPB) on Cellular and Molecular Mechanisms for Physiological Adaptation to Multiple Stress Bilbao, Spain, 02-05 September 2012*

C. Dupuy, **C. Galland**, I. Calves, M. Auffret, M. Labonne, L. Quiniou, V. Pichereau, J. Laroche. 2011. Responses of flounder populations to multi-stress in estuaries :immunotoxicity, biochemical biomarkers, isotopes, life-history traits and population genetics. *Joint meeting CHRONEXPO/DIESE at the University of Caen, INTERREG IV. 30-31 August 2011*

C. Galland, C. Dupuy, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau 2011 Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to contamination : a proteomic approach. *Joint meeting CHRONEXPO/DIESE at the University of Caen, INTERREG IV. 30-31 August 2011*

Communications orales en congrès national (auteur ayant effectué la présentation):

C. Galland, C. Dupuy, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau 2012 Réponses du flet européen à la contamination chimique : approche protéomique. *Congrès annuel de la société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée, Lyon, 4 et 5 juillet 2012*

Posters en congrès internationaux :

C. Galland, C. Dupuy, C. Capitaine, I. Calves, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau 2011 Comparisons of liver proteomes in European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *8st international flatfish symposium – 5,11 novembre 2011- IJmuiden, The Netherlands -*

J. Laroche, I. Calves, C. Dupuy, **C. Galland**, M. Auffret, V. Pichereau, C. Capitaine, M. Labonne, E. Dabas, JM. Munaron, F. Guérard, L. Quiniou, G. Claireaux, M. Theron, A. Amerand, V. Loizeau, D. Mazurais, J. Zambonino, N. Le Bayon, H. Cabral, R. Vasconcelos, S. Franca, M. Fournier, C. Couillard. 2011. Approche intégrative de la réponse de populations de poissons aux multi-stress en milieu estuarien. *ECOBIM 2011 : Atelier international sur l'évaluation du stress environnemental (Effets biologiques des contaminants chimiques chez les bivalves et les poissons). Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Quebec, 6-9 juin 2011*

I. Calves, **C. Dupuy**, E. Lavergne, **C. Galland**, C. Capitaine, N. Pedron, G. Charrier, B. Guinand, L. Quiniou, J. Laroche. 2011. Structure génétique et réponses aux multi-stress de populations de flet (*Platichthys flesus*) sur un cline latitudinal. *ECOBIM 2011 : Atelier international sur l'évaluation du stress environnemental (Effets biologiques des contaminants chimiques chez les bivalves et les poissons). Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Quebec, 6-9 juin 2011*

C. Galland, **C. Dupuy**, C. Capitaine, I. Calves, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau. 2011. Réponse du flet européen *Platichthys flesus* à la contamination par les HAP/PCB : approche par électrophorèse 2D. *ECOBIM 2011 : Atelier international sur l'évaluation du stress environnemental (Effets biologiques des contaminants chimiques chez les bivalves et les poissons). Institut Maurice-Lamontagne, Mont-Joli, Quebec, 6-9 juin 2011*

C. Galland, C. Dupuy, C. Capitaine, I. Calves, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche, V. Pichereau. 2011. Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to PAH/PCB contamination. *SETAC Europe Annual meeting, Milan, Italy, 15-19 May 2011*

Manifestations de diffusion de la science :

L. Quiniou, **C. Galland**, C. Dupuy, E. Lavergne, E. Dabas, B. Gobert. 2012. Le projet ANR Evolfish : réponse du Flet européen au changement global. *Tonnerres de Brest 2012, Fête maritime internationale Brest, 13-19 juillet 2012.*

C. Galland, B. Gobert. 2011. Les algues, un arc en ciel de couleurs. *Quartiers des sciences 2011, Brest*

C. Galland. 2011 Réponses des organismes aux contraintes environnementales : adaptation et acclimatation. L'exemple du flet européen en milieu estuarien. *Forum des doctorants de l'association Merscidoc. Brest, 10 février 2011*

Participations aux journées portes ouvertes du laboratoire et forum étudiants

Listes des abréviations récurrentes

2D, 2DE, 2-DE	en 2 dimensions
5-HT	sérotonine
ABC (transporteurs)	ATP Binding Cassette transporters
Ach	Acétylcholine
AChE	acétylcholine estérase
ACTH	adrenocorticotropine hormone
AD	adrénaline
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide glucuronique
AhR	aryl hydrocarbon receptor
AR	Androgène receptor
ARNm	ARN messenger
ARNT	hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adénosine triphosphate
axes HPG ou HPT	Hypothalamo-pituitary-gonadique ou thyroïdien
B(a)P	Benzo(a)pyrene
BaP	Benzo(a)pyrène
BHMT	Betaine homocystéine méthyle transférase
C3	Complexe 3 du système du complément
CAM	calmodulin
CAR	constitutive androstane receptor
CAT	catalase
CBB	Bleu deCoomassie
CCO	Cytochrome C oxydase
CoA	Co-enzyme A
CRF	cortisol releasing factor
CRP	protéines C réactives
CYP, CYP450, CYP1A	cytochromes P450 1A
DA	dopamine
DCE	Directive cadre sur l'eau
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane)
DE₅₀	dose efficace 50
DL₅₀	dose létale 50
ENO	enolase
ER	Œstrogène receptor

ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EROD	ethoxyresorufine-O-deethylase
EST	Expressed sequence tag
FADH₂	Flavine Adénine Dinucléotide H ₂
FBPA	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase
GABA	Gamma amino butyric acid
GPx	Glutathion peroxydase
GSH, GSSG	Glutathion oxydé, glutathion réduit
GST	Glutathion-S-transferase
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HSC	Heat shock cognate
HSP	Heat shock proteins
HSE	Heat Shock element
HSF-1	Heat Shock Factor
HSP90	Heat Shock protein 90
IARC	Agence internationale de recherche sur le cancer
IC ; CF	Indice de condition ; condition factor
JNK	c-Jun Nterminal Kinase
LDH	lactate déshydrogénase
LOEL	Lowest Observed Effect Level
MALDI TOF-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation time-of-flight mass spectrometry
MAO	monoamineoxydase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDA	malondialdehyde
MDH	Malate deshydrogenase
MDR	multidrug resistance
MFO	oxydase à fonctions mixtes
MRP	multi drug resistance-associated proteins
MS-MS	spectrométrie de masse en tandem (Tandem mass spectrometry)
MT	Métallothionéine
MXR	mutli xenobiotic resistance
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH₂	NAD, le même que p 25 ? (Nad)
NADP+, NADPH	Nicotinamide dinucléotide phosphate
NDPK	Nucleoside diphosphate kinase
NK	natural killer
NK-like	Natural-killer like

NOEL	No Observed Effect Level
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
OATP2	organic anions transporting polypeptides 2
PBDE	Benzo(a)Pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxyde
PCA	Principal component analysis
PCB	polychlorobiphényles
PCB-dl	PCB dioxine like
PCBi	PCBs indicateurs
PCB-ndl	PCB non dioxine like
PES	Protein expression signature
P-gp	P-glycoprotéines
POMC	pro-opiomélanocortine
PTM	post translational modification
PXR	pregnane X receptor
qPCR	PCR quantitative
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNA/DNA	Rapport ARN/ADN
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RXR	Retinoid X receptor
SELDI-MS	surface-enhanced laser desorption/ionisation mass spectrometry
SHMT	Sérine hydroxy méthyle transférase
SOD	Superoxyde dismutase,
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
SXR	Steroid or xenobiotic receptors
TAG	triacylglycérols
TBT	tributylétain
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TNF	Tumor necrosis factor
TNF	Tumor necrosis factor
VDSI	vas deferens sequence index
VTG	vitellogénine
VTG	vitellogenine
XRE	xenobiotic regulatory element
ZRP	zona radiata protein

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	7
LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	11
LISTES DES ABREVIATIONS RECURRENTES	15
SOMMAIRE.....	19
CHAPITRE 1 : CONTEXTE DE L'ETUDE	23

Introduction	25
---------------------------	-----------

I. Les estuaires, des milieux naturellement variables	26
A. Définitions.....	26
B. Contraintes et variabilités naturelles.....	26
C. Importance écologique, fragilité et vulnérabilité	30
D. Contraintes d'origine anthropique	31
1. Le changement global	31
2. Pollution chimique.....	33
a) Propriétés des xénobiotiques dans l'eau, définitions	34
b) Métaux	36
c) Les Hydrocarbures.....	37
d) Les polychlorobiphényles (PCB)	38
e) Les pesticides, biocides, produits phytopharmaceutiques	38
f) Contaminants émergents	39
E. Conclusion.....	39
II. Effets biologiques des xénobiotiques	41
A. Toxicocinétique.....	41
1. Absorption	41
2. Distribution	42
3. Métabolisme, biotransformation.....	42
a) Métabolisme de phase I.....	43
b) Métabolisme de phase II	43
c) Bioactivation.....	44
4. Elimination ou excrétion	44
B. Toxicodynamique, effets des xénobiotiques	45
1. Neurotoxicité et comportement	46
2. Immunotoxicité	48
3. Perturbation endocrinienne.....	50
4. Métabolisme énergétique.....	53
C. Mécanismes d'action et de réponse	55
1. Mécanisme général de la réponse au stress	55
a) Au niveau physiologique : L'axe corticotrope	55
b) Au niveau moléculaire : Heat shock proteins (HSP)	57
2. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse au stress chimique	59
a) Voies dépendantes des récepteurs nucléaires.....	59
b) Voies de signalisations intracellulaires et phosphorylations.....	60
c) Stress oxydant	62
3. Conclusion.....	65

III. Utilisation des marqueurs biologiques ou bioindicateurs dans le suivi de la qualité des milieux.....	66
A. Ecoindicateurs et espèces indicatrices et espèces sentinelles	66
1. Les juvéniles de flet européen, <i>Platichthys flesus</i> , espèce sentinelle des estuaires	67
B. Biomarqueurs	70
C. Approches globales et sans a priori	74
a) Approches protéomiques.....	74
b) Biologie des systèmes	78
IV. Objectifs de la thèse.....	79
CHAPITRE 2 : CARTOGRAPHIE DU PROTEOME DE 4 ORGANES CHEZ LE FLET EUROPEEN <i>PLATICHTHYS FLESUS</i> PAR ELECTROPHORESE EN 2 DIMENSIONS.....	81
Introduction	83
Plan expérimental	83
Synthèse des résultats.....	87
Conclusion.....	88
Article 1: Towards a tissue proteome maps in the European flounder (<i>Platichthys flesus</i>).....	90
CHAPITRE 3 : REPONSE DU FLET EUROPEEN <i>PLATICHTHYS FLESUS</i> A LA CONTAMINATION CHIMIQUE PAR UN MELANGE DE HAP ET PCB : APPROCHE EXPERIMENTALE	115
Introduction	117
Plan expérimental	118
Synthèse des résultats.....	121
Conclusion et perspectives	122
Article 2 : Proteomic analysis of the European flounder <i>Platichthys flesus</i> response to experimental PAH-PCB contamination.....	125
Article 3: Responses of the European flounder (<i>Platichthys flesus</i>) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions	155
CHAPITRE 4 : REPONSE DU FLET EUROPEEN <i>PLATICHTHYS FLESUS</i> A LA CONTAMINATION CHIMIQUE EN CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES.....	175
Introduction	177
Plan expérimental	178
Résultats et discussion	180
Conclusion et perspectives	182
Article 4 : Comparisons of liver proteomes in the European flounder <i>Platichthys flesus</i> from three contrasted estuaries	183

Article 5 : Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the British Channel, considering biomarkers and life history traits	193
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	209
I. Principaux apports dans la compréhension des mécanismes	211
A. Intégration des résultats.....	211
1. Du gène à l'organisme.....	215
2. Du laboratoire au terrain	220
V. Identification de nouveaux biomarqueurs potentiels ?	223
A. Les critères	223
B. Les candidats.....	224
1. VMO-I.....	225
2. BHMT	225
C. Assumer le manque de spécificité : évaluer l'adéquation entre milieu et organisme	230
D. Conclusion.....	232
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	233

Chapitre 1 : Contexte de l'étude

Introduction

La directive cadre sur l'eau qui s'applique à toutes les eaux souterraines comme superficielles y compris les eaux de transition estuariennes, (DCE, *Directive 2000/60/EC*), et la directive cadre Stratégie pour le milieu marin (2008/56/CE), définissent des objectifs d'atteinte d'un « bon niveau de qualité écologique » respectivement pour 2015 et 2020. La DCE implique notamment une diminution (voire une suppression) de substances préoccupantes et fixe les normes seuils de contaminants chimiques dans les milieux. Il est donc nécessaire de développer des outils de suivi de la qualité de ces écosystèmes dans son ensemble.

Dans ce contexte, le programme Interreg IV transmanche DIESE (Détermination d'Indicateurs Environnementaux pertinents : une Stratégie pour l'Europe) a pour objectif d'identifier la concentration et les effets sur l'environnement aquatique de polluants couramment rencontrés dans les écosystèmes en s'appuyant sur de nouveaux outils. Les outils développés devraient permettre d'améliorer les méthodes d'estimation de la qualité des écosystèmes aquatiques.

Les estuaires sont des écosystèmes d'une grande valeur écosystémique, notamment en raison de leur production importante (Costanza *et al.*, 1997). Cependant, ils sont fortement soumis aux pressions anthropiques parmi lesquelles la pollution chimique. Ce premier chapitre a pour objectif de présenter les contraintes auxquelles sont soumises les espèces estuariennes. Les effets de la pollution chimiques et leurs mécanismes seront ensuite présentés. Enfin, les différentes méthodes biologiques de suivi et notamment les avantages d'une approche par biomarqueurs seront exposés dans une troisième partie. Afin de développer les approches par biomarqueurs, il est nécessaire d'améliorer notre compréhension des mécanismes des effets des polluants sur les organismes. Les approches –omics, globales et sans *a priori*, ont un grand potentiel pour aller dans ce sens. L'objectif de cette thèse est ainsi de d'étudier la réponse à la contamination chimique du Flet européen *Platichthys flesus*, espèce considérée comme sentinelle des estuaires, afin d'améliorer notre connaissance des mécanismes de réponse aux polluants et, éventuellement, d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels.

I. Les estuaires, des milieux naturellement variables

La rédaction de cette partie s'appuie, sauf précision, sur les ouvrages de Ducrottoy (2010), Dobson (2009) et Van Coillie (2011).

A. Définitions

D'un point de vue écologique, un estuaire est défini comme « une zone aquatique semi-fermée, qui est connectée à la mer de façon permanente ou périodiquement, qui présente une salinité différente de celle de l'océan ouvert adjacent, en raison des apports d'eau douce, et qui inclut un biotope caractéristique » (Elliott et Whitfield, 2011).

Ces milieux sont donc particulièrement variables et la limite entre domaine maritime et fluviale difficile à fixer. La législation européenne intègre cette variabilité en incluant les estuaires dans les zones de transition (directive cadre sur l'eau 2000/60/CE, DCE).

B. Contraintes et variabilités naturelles

De façon naturelle, en raison de leur statut d'eau de transition, les estuaires sont soumis à de nombreuses contraintes et à une grande variabilité des paramètres physico-chimiques comme la salinité, la température, l'oxygénation et les apports en nutriments et particules organiques (Elliott et Whitfield, 2011).

Leurs caractéristiques physico-chimiques sont structurées notamment par la géologie de chaque estuaire. Quatre types d'estuaires sont ainsi décrits : (1) les estuaires de plaines maritimes, estuaires les plus répandus notamment en Atlantique Nord ; (2) les estuaires types fjords ; (3) les estuaires semi-fermés par une barre sableuse sédimentaire partielle ou temporaire, souvent retrouvés au Moyen-Orient, par exemple ; (4) les estuaires complexes créés par des forces tectoniques comme la baie de San Francisco aux Etats-Unis (Pritchard, 1967). La morphologie des fonds estuariens, la composition de leurs sédiments et la taille de leur embouchure résultent de ces caractéristiques géologiques.

Leur fonctionnement hydro-sédimentaire dépend par ailleurs du régime marégraphique et de l'amplification ou l'amortissement de ce phénomène par les apports en eau douce. On parle donc d'estuaire microtidal lorsque l'amplitude des marées est inférieure ou égale à 2 m, mésotidal de 2 à 4 m, mégatidal de 4 à 8 m et enfin hyper tidal au-delà de 8 m d'amplitude (Dobson, 2009). Ce fonctionnement hydrologique va conditionner le mélange des eaux marines apportées par les marées, avec les eaux douces apportées par le fleuve directement ou par ruissellement et percolation sur tout le bassin versant ou la zone péri-estuarienne (figure 1).

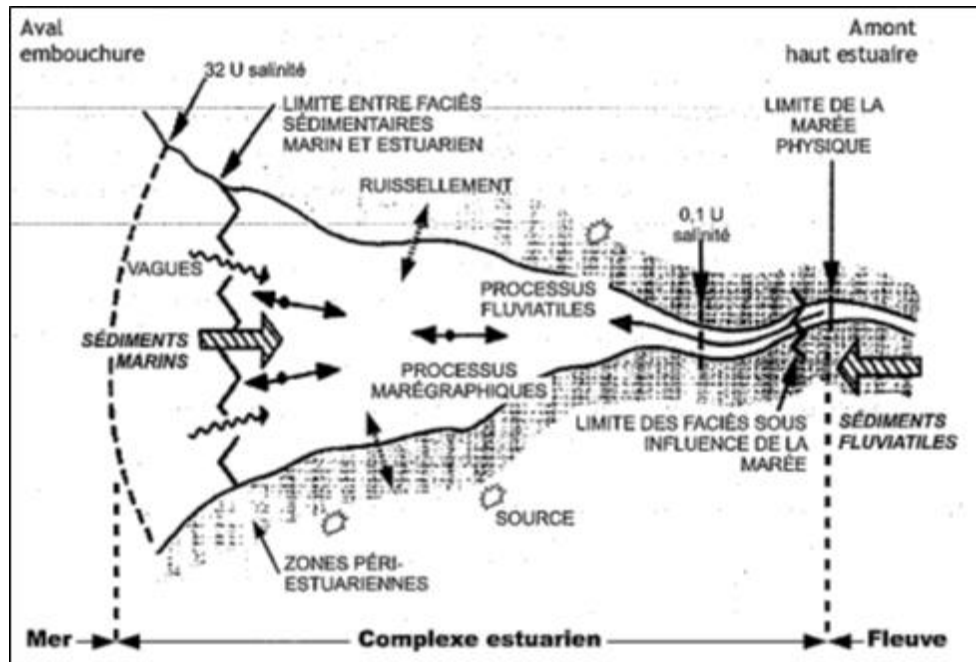


Figure 1: Dynamique hydro-sédimentaire dans un estuaire à marée (Ducrotoy, 2010, modifié d'après Cloern et Nichols, 1985)

Ce mélange des eaux est à l'origine du **gradient de salinité** au long d'un estuaire (Dobson, 2009). Ce gradient de salinité est souvent considéré comme le principal paramètre structurant des estuaires. Il résulte en effet du brassage des eaux d'origine marine et continentale. D'autre part, plus la salinité d'une masse d'eau est élevée, plus sa densité est forte. Il existe donc un gradient vertical de salinité, le halocline, à l'interface des eaux douces continentales supérieures avec les eaux salées océaniques inférieures et dépendant de leur brassage. Ce gradient dépend en fait du pycnocline, c'est-à-dire de la différence de densité induite par la combinaison de la température et de la salinité.

Ce gradient de salinité se reflète dans la répartition des espèces tout au long de l'estuaire. Ainsi, le milieu estuarien présente une gradation d'espèces marines dans les zones de salinité élevées vers des espèces d'eau douce en amont. La zone intermédiaire présente des espèces purement estuariennes en plus de quelques individus d'espèces d'eau douce ou marines présentant de larges capacités d'acclimatation à la variation de salinité. Les estuaires sont également des zones importantes dans le cycle de vie des espèces diadromes, effectuant des migrations entre les eaux océaniques et fluviales au cours de leur vie (Whitfield et al., 2012).

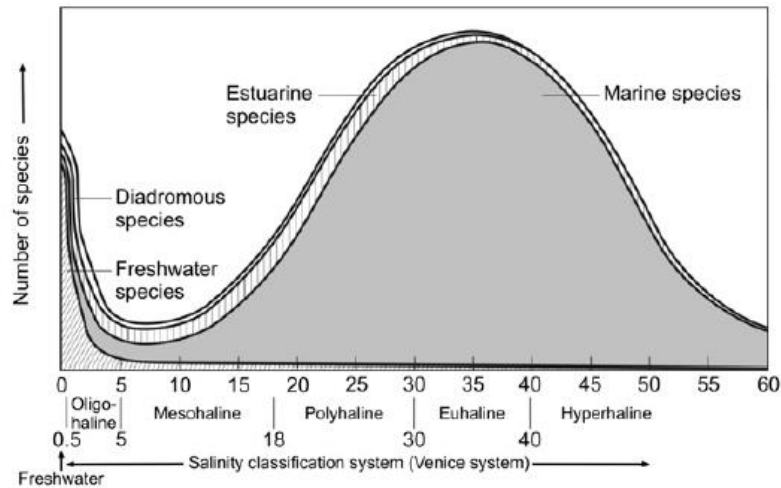


Figure 2 : Modèle des changements d'espèces le long du gradient de salinité des eaux douces aux eaux salées (d'après Whitfield et al., 2012)

Malgré tout, la salinité ne doit pas être considérée comme le seul paramètre structurant des estuaires. Les eaux d'origines continentale et marine diffèrent également en termes de composition en **nutriments** et en **température**. La température de l'eau et sa salinité sont des facteurs déterminants de la densité des masses d'eau et participent au mélange entre les eaux océaniques et les eaux continentales. Le brassage et les mécanismes hydromécaniques sont à l'origine de variations locales de la **teneur en dioxygène** des eaux de l'estuaire. Tous ces paramètres interagissent entre eux. Par exemple, une température élevée est associée à une plus faible teneur en dioxygène de l'eau et à une production primaire de nutriments plus importante.

Par ailleurs, les forces mécaniques résultantes à la fois de la marée, de la houle, du débit du fleuve, et influencées par la morphologie des fonds de l'estuaire, sont responsables de la disposition et de la dynamique des **sédiments** dans l'estuaire. On observe également une gradation depuis les vases et sables vaseux en amont de l'estuaire aux sables marins à l'embouchure. Un bouchon vaseux, zone de turbidité élevée où se retrouve une concentration de sédiments en suspension, peut également apparaître sous l'effet de la conjugaison d'un faible débit fluvial et d'un fort effet de pompage de la marée, notamment en période estivale (Ducrotoy, 2010).

Des événements naturels ponctuels ou cycliques comme les variations saisonnières de température et de précipitation peuvent remodeler drastiquement la structure de l'estuaire. Une période de crue survenant après une longue période de sécheresse (plusieurs années) peut par exemple remodeler la répartition des sédiments, ces derniers étant remis en suspension,

désenvasant l'estuaire, et apporter un flux massif d'eau douce et de nutriments d'origine continentale. L'augmentation du débit favorise également l'oxygénation des eaux estuariennes (Cloern et Nichols, 1985).

En conclusion, chaque estuaire est structuré par ses propres caractéristiques géologiques, les caractéristiques des apports d'eau douce fluviales (débit, composition physico-chimique), le régime marégraphique, les caractéristiques physico-chimiques des eaux marines et surtout par les interactions de tous ces paramètres entre eux (figure 3). Ces derniers subissent des variations journalières, saisonnières, interannuelles, ou ponctuellement exceptionnelles. Chaque estuaire est donc intrinsèquement un système très variable.

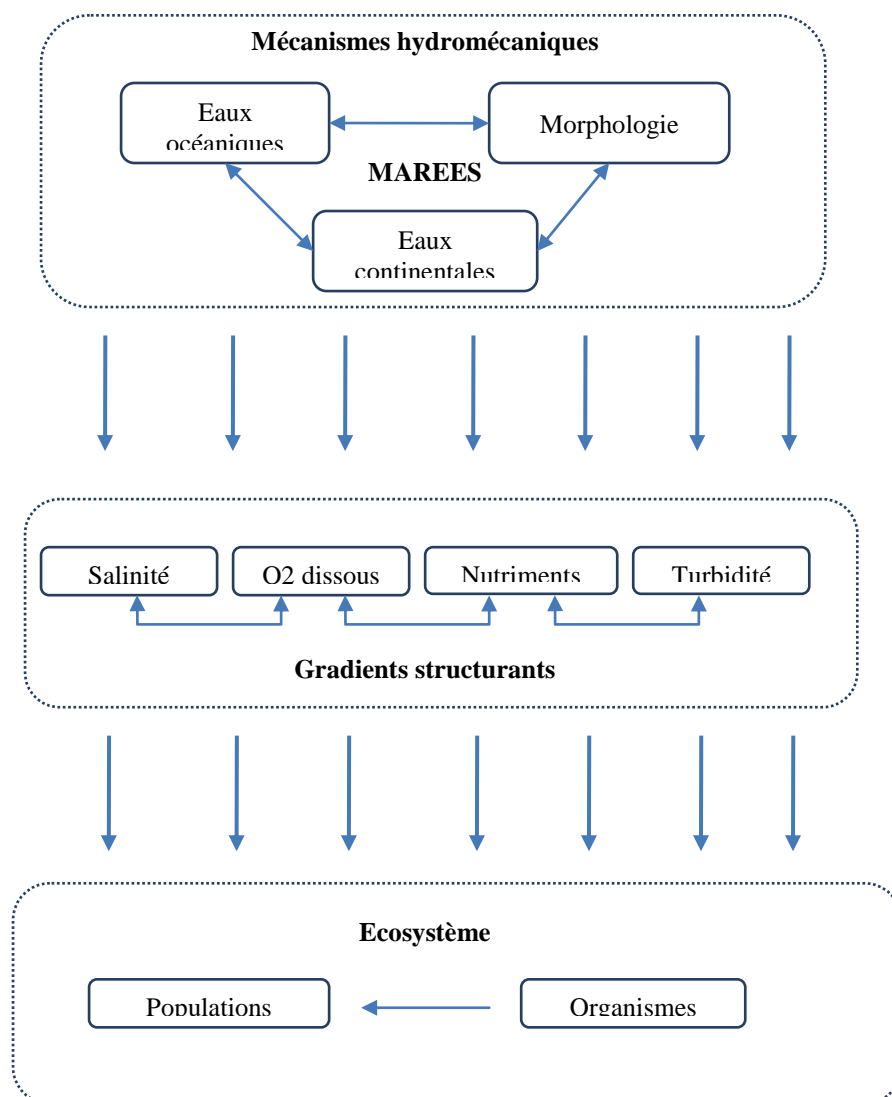


Figure 3 : Diagramme présentant les interactions entre les différents paramètres physico-chimiques dans les estuaires.

Cette diversité et variabilité du milieu notamment en termes de salinité, d'oxygénation, de nutriments ou de température est souvent considérée comme une contrainte. Cependant, Nicolas *et al.* (2010) ont montré par l'étude de 135 estuaires le long de la côte atlantique nord-est, que les principaux paramètres responsables de la biodiversité d'un estuaire sont sa taille, sa profondeur et la largeur de son embouchure. Ce résultat suggère notamment que plus un estuaire est grand, plus il sera susceptible d'abriter des habitats différents et donc de regrouper des espèces différentes. La variabilité des paramètres physico-chimiques d'un estuaire peut donc aussi être vue d'un point de vue écologique plus comme une source de richesse ; la variabilité des facteurs abiotiques représentant surtout une contrainte pour les espèces marines ou d'eau douce (Elliott et Quintino, 2007).

C. Importance écologique, fragilité et vulnérabilité

Bien que les estuaires présentent une biodiversité importante en relation avec des habitats diversifiés, les conditions peuvent être tellement spécifiques pour chaque niche écologique que seules quelques espèces y sont adaptées. Ce manque de redondance parmi les espèces pour un même habitat entraîne une grande vulnérabilité des estuaires face à un déséquilibre de leur dynamique écologique (Elliott et Whitfield, 2011).

Ces écosystèmes doivent ainsi être particulièrement protégés de toute dégradation. Leur situation d'interface entre continent et océan en fait une zone particulièrement importante écologiquement (Costanza *et al.*, 1997). Ils réceptionnent et filtrent les nutriments provenant de la terre mais sont également le lieu d'une production particulièrement importante. Ils ont par ailleurs un rôle important de refuge pour de nombreuses espèces. Les estuaires, et leur zone péri-estuarienne, sont des zones dans lesquelles on retrouve une grande densité de vasières, prairies humides et de roselières où de nombreux oiseaux se retrouvent, notamment en période d'hivernage ou transitoirement lors de la migration.

Par ailleurs, les estuaires sont reconnus comme servant de **nourricerie** pour de nombreuses espèces (Beck *et al.*, 2001, 2003 ; Able, 2005 ; Vasconcelos *et al.*, 2008, 2009, 2011). Une zone est considérée comme nourricerie pour une espèce de poisson ou d'invertébrés si ses jeunes :

- s'y trouvent en densité plus importante,
- y survivent mieux et y sont relativement abrités de la prédation,

- présentent une croissance plus rapide que dans d'autres habitats en lien avec une abondance de proies,

- peuvent rejoindre facilement les habitats de la population adulte. Par exemple, les espèces catadromes de poisson se reproduisent en mer, les larves migrent dans les estuaires où les juvéniles se développent. Une fois arrivés à maturité sexuelle, ces derniers migrent vers l'embouchure des estuaires.

Les cycles de vie, et notamment la reproduction, de deux grands groupes de prédateurs supérieurs dans la chaîne trophique sont de cette façon directement liés aux conditions trouvées en estuaire.

Les estuaires présentent donc de nombreuses ressources et leur statut de zone de transition entre le continent et l'océan ont conduit les hommes à utiliser ces atouts. En effet, de nombreux estuaires sont, ou ont été, d'importantes zones de transport fluvial ou portuaire par exemple (Seine, Loire, Elbe...). Cette importante présence de l'homme a depuis toujours modelé la physionomie des estuaires mais les modifications de l'environnement induites par l'homme se sont intensifiées, notamment depuis l'ère industrielle et l'intensification de l'agriculture ces dernières décennies. Ces altérations peuvent s'avérer être une menace pour cet écosystème et ses fonctions comme celles de nourriceries (Le Pape et al., 2007 ; Courrat *et al.*, 2009).

D. Contraintes d'origine anthropique

1. Le changement global

A l'ensemble de ces paramètres naturels structurants les estuaires, se rajoutent de nombreuses contraintes d'origine anthropique qui modifient le milieu. Le changement global est défini comme la combinaison de la variabilité naturelle du milieu avec le changement climatique global et les impacts anthropiques (Rabalais *et al.*, 2009). Ainsi, le passage des navires et la construction d'**infrastructures** (ports, barrages hydrauliques, canalisation de cours d'eau...) modifient la morphologie des fonds estuariens et détruisent de nombreux habitats. La canalisation de cours d'eau et la construction de barrages entraînent également une régulation du débit des eaux continentales et un nivellement des variations saisonnières ou ponctuelles naturelles (Kennish, 2002).

Le changement climatique global s'accompagne d'une hausse du niveau de la mer, mais aussi d'une modification du régime des précipitations et des vents susceptible de modifier les

mécanismes hydromécaniques qui ont lieu dans les estuaires et donc le gradient de salinité. De plus, le réchauffement climatique entraîne une augmentation de la température des eaux ayant pour conséquence une modification des courants, de la dissolution du dioxygène dans l'eau et de la production en nutriments (Kennish, 2002).

La combinaison des modifications de température et de salinité est susceptible de modifier le pycnocline et donc de modifier la colonne d'eau (Rabalais *et al.*, 2009). Des pycnoclines plus marquées entraînent une diminution de la diffusion de l'oxygène. Un système souffrant d'une baisse de débit du fleuve (lié à un barrage hydraulique par exemple), d'une baisse de la teneur en dioxygène et d'une augmentation de la production en nutriments est un système qui tend à s'**eutrophiser** (Cloern, 2001). C'est ce phénomène qu'on peut observer par exemple dans l'estuaire de la Vilaine en France (Menesguen *et al.*, 2001).

Les activités humaines sont également à l'origine de l'introduction **de nouvelles espèces** dans le système. Nehring (2006) a observé par exemple dans l'estuaire de l'Elbe (Allemagne) que les estuaires sont parmi les milieux aquatiques les plus exposés aux espèces invasives et que celles-ci colonisaient majoritairement la zone de mélange des eaux. Il a proposé trois éléments d'explication :

- Les estuaires sont le lieu d'un passage intensif de bateaux et donc sont potentiellement plus sujets que d'autres milieux aquatiques à la colonisation par les espèces invasives, à la fois par les apports océaniques et par des apports venant par voie continentale,
- Les espèces estuariennes ont intrinsèquement plus de capacités d'acclimatation que d'autres espèces et ont donc plus de chances de survivre à un transport puis de s'installer dans un nouveau milieu,
- Certaines niches écologiques présentent une faible redondance spécifique et donc d'une certaine façon une capacité d'accueil pour les espèces invasives.

De même les activités de **pêche** prélèvent des individus dans les estuaires. En France par exemple, les espèces telles que aloses, anguille/civelle, bar, crevette blanche, lamproies, maigre, mullets sont classiquement prélevées en estuaire. La surpêche est à l'origine du déclin des populations des espèces concernées ce qui entraîne une réorganisation de la dynamique de l'écosystème (Kappel, 2005 ; Jackson *et al.*, 2001)

2. Pollution chimique

Les activités humaines sont également souvent à l'origine du déversement de molécules dans le milieu aquatique soit directement, soit après percolation des eaux dans les sols ou par retombée de particules diffusées dans l'air. Un agent polluant est une molécule pouvant exercer des influences perturbatrices sur l'environnement. Si ces agents présentent des teneurs supérieures aux teneurs naturelles, on parle de contamination. Lorsque ces teneurs excessives sont à l'origine des effets néfastes sur les organismes biologiques, les agents sont considérés comme toxiques (Van Coillie et Parent, 2011).

On distingue la pollution chronique, diffusée dans l'environnement sur une longue période, de la pollution accidentelle, diffusée ponctuellement mais souvent avec une plus grande intensité.

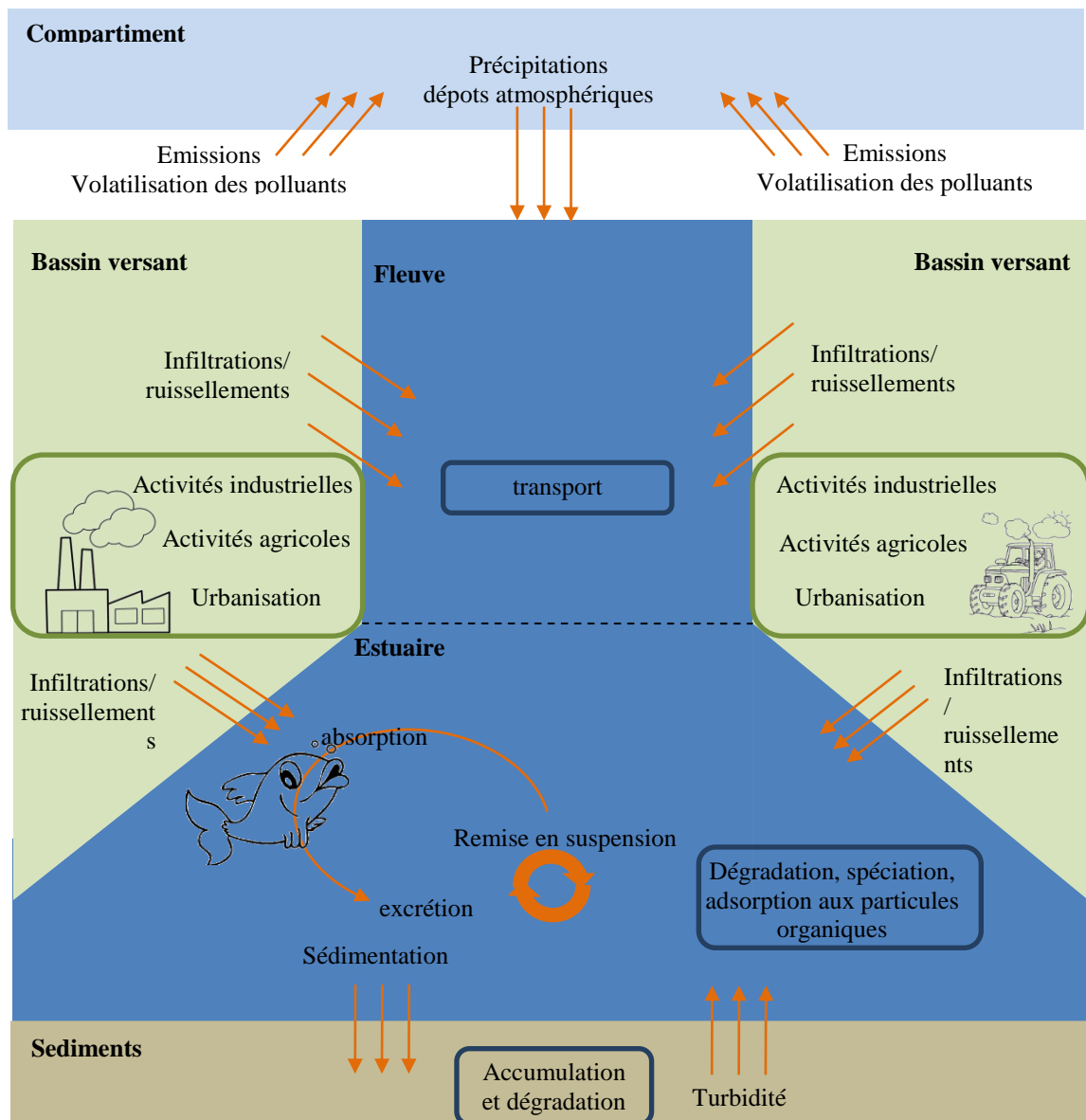
a) *Propriétés des xénobiotiques dans l'eau, définitions*

Figure 4 Sources et devenir des polluants dans les estuaires.

Le devenir des xénobiotiques dans l'eau est régi par différents mécanismes, plus ou moins favorisés suivant leurs propriétés physico-chimiques (figure 4):

-la **volatilisation** : passage de l'état dissous dans l'eau à l'état gazeux dans l'atmosphère. Elle est décrite par la constante de Henry ($C_{ste} H$ en $\text{Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$). Plus cette constante est élevée, plus le polluant sera retrouvé dans l'atmosphère. Cependant, cette valeur n'étant calculée que pour des molécules en solution dans de l'eau pure, elle ne représente qu'une approximation de ce qui se passe en condition environnementale.

- la **solubilité** dans l'eau : elle mesure la capacité de passage d'une substance solide ou gazeuse à l'état dissous dans l'eau. Plus une substance est soluble dans l'eau, plus elle sera entraînée par les précipitations par exemple. Les polluants organiques sont en général peu solubles dans l'eau. Le **coefficient de partage octanol-eau** (K_{ow}) permet de mesurer l'affinité d'une substance dans l'eau (caractère hydrophile) ou dans les phases organiques non miscibles à l'eau (caractère hydrophobe ou lipophile). Plus le K_{ow} est fort, plus la substance est hydrophobe.

Ces paramètres déterminent le compartiment dans lequel les polluants vont être transférés et donc leur capacité à intégrer le compartiment biologique (**biodisponibilité**).

-la **sorption** divisée en :

- l'*adsorption* : passage d'une substance de l'état dissous dans l'eau à l'état fixé à la surface d'une phase solide. Elle peut favoriser la dégradation ou la modification des composés en les mettant en contact avec d'autres molécules ou microorganismes avec lesquels elle réagit,

-l'*absorption* : ingestion ou intégration par les cellules ou organismes d'une substance dissoute dans l'eau.

Certains composés auront une affinité particulière pour la matière organique en suspension et les sédiments (mesuré par le coefficient de partage carbone organique-eau, K_{oc}). Ils peuvent également avoir tendance à s'accumuler dans les êtres vivants à une teneur supérieure à ce qu'on retrouve dans l'environnement c'est-à-dire avoir un facteur de **bioaccumulation** élevé. La bioaccumulation d'une substance dans un organisme peut se faire à partir de son milieu (eau, air, sol...) par bioconcentration et/ou à partir son alimentation par biotransfert. Lorsque la concentration de la substance augmente au long de la chaîne trophique, la substance est dite **bioamplifiée** (biomagnification en anglais).

Dans l'environnement, tous les polluants sont susceptibles de subir des transformations chimiques ou biologiques modifiant leurs propriétés physico-chimiques. Ils peuvent être **dégradés ou métabolisés** chimiquement ou biologiquement (c'est alors la biotransformation). On retrouve les métaux chimiquement modifiés sous différentes espèces (oxydée, complexée...) après la spéciation alors que les polluants organiques sont biotransformés par les organismes vivants dans le milieu. Les **métabolites** (produits de dégradation) peuvent parfois s'avérer plus toxiques que les molécules parentes et doivent

donc être pris en compte comme polluants à part entière. Certaines molécules, comme beaucoup de métaux, ont la capacité de s'ioniser (mesuré par leur constante de dissociation) et deviennent alors particulièrement solubles dans l'eau. Au contraire, elles peuvent également se complexer avec d'autres éléments comme la matière organique, devenir insolubles et se déposer dans les sédiments. La complexation peut aussi parfois limiter les capacités de précipitation d'une molécule (passage de l'état dissous à l'état solide dans l'eau) et favoriser sa solubilité. Par ailleurs, l'eau entre en jeu dans les mécanismes d'oxydoréduction (transfert d'électrons d'un réducteur à un oxydant). La solubilité dans l'eau des composés dépend de leur état réduit ou oxydé. Un milieu oxygéné comme les eaux de surface est plutôt oxydant alors qu'un milieu pauvre en dioxygène dissous comme les eaux proches des sédiments représente plutôt un milieu réducteur. Ainsi, une même molécule peut être présente à différents états et présenter des propriétés différentes de solubilité (et donc de biodisponibilité) en fonction de sa répartition dans la colonne d'eau et de l'oxygénation des eaux.

Au contraire, un polluant non biodégradable, se concentrant dans les sédiments, est dit **rémanent**. Sa désorption peut avoir lieu lors de la remise en suspension des sédiments et être la source d'un pic de pollution ponctuel. La durée nécessaire pour que la teneur en une substance soit divisée par deux grâce aux mécanismes de transformation ou de dégradation par exemple est la demi-vie ($t_{1/2}$).

b) Métaux

Les métaux sont des composés ayant une origine naturelle mais dont la concentration peut artificiellement augmenter suite à l'activité humaine. La pollution métallique est très ancienne et provient d'activités telles que les extractions minières, la production industrielle, l'usage des piles et batteries, les peintures et colorants. Certains métaux peuvent également provenir de sources plus spécifiques comme le cadmium présent dans certains engrais phosphorés. Les métaux les plus toxiques pour l'environnement sont le mercure, le cadmium, le zinc, le cuivre et le nickel. Cependant, d'autres métaux comme le fer et le manganèse peuvent être utilisés comme traceurs et indicateurs des autres métaux (Bryan, 1971).

Ces dernières années la concentration en métaux a diminué dans les estuaires grâce à la mise en place de politiques environnementales mais une quantité significative peut encore être retrouvée dans les tissus de certains animaux (Dobson 2000 ; Harmens *et al.*, 2007,2008 ; Maes *et al.*, 2008).

De plus, certains métaux ont une rémanence importante dans l'écosystème. Ils ne sont pas biodégradables et se concentrent dans les sédiments. Ils sont absorbés par les organismes et on observe une bioamplification importante le long de la chaîne trophique. Cette propriété a abouti à des catastrophes sanitaires sur des populations humaines comme au Japon lors de la catastrophe de Minamata (Ekino *et al.*, 2007).

c) Les Hydrocarbures

Les hydrocarbures sont les produits pétroliers (pétroles bruts ou raffinés...) et des produits de base de la synthèse organique industrielle. Ils sont souvent la source d'une pollution accidentelle par déversement direct dans les eaux, qui peut être très spectaculaire par son ampleur et ses effets sur les écosystèmes comme dans le cas de marées noires, par exemple. Ils font alors l'objet d'études spécifiques qui n'entrent pas dans le cadre de cette étude.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) résultent de la combustion des hydrocarbures et de leurs dérivés. Ils sont parmi les seuls contaminants, avec les métaux, à avoir une source naturelle comme anthropique. Les feux de forêts, des fuites de nappes de pétroles... entraînent une présence naturelle de HAP dans les écosystèmes mais en très faible quantité. Au contraire, ces composés toxiques sont produits en quantité importantes par les activités humaines (moteurs automobiles, chauffages, industries...) ce qui rend la contamination par ces substances préoccupante. La contamination des milieux aquatiques par les HAP se fait donc majoritairement par voie atmosphérique, -transfert air/eau et est souvent chronique. Ces molécules sont majoritairement hydrophobes et se fixent sur les particules organiques du milieu aquatique. Leur dispersion est donc très liée à la dynamique sédimentaire. Ils peuvent par exemple être remis en suspension lors d'épisodes de brassage des sédiments, l'estuaire lui-même devenant alors une source de pollution par les HAP.

Les HAP étant souvent émis sous forme de mélange, le suivi d'un seul d'entre eux permet d'avoir une idée de l'importance de la contamination des écosystèmes.

Les HAP peuvent également rentrer dans les réseaux trophiques et peuvent être métabolisés par certains organismes. Il peut alors arriver que les métabolites soient plus toxiques que les molécules initiales (Salas et Burchiel, 1998). Par exemple, le Benzo(a)pyrene (B(a)P) est considéré comme l'un des HAP les plus toxiques notamment en raison de la toxicité de l'un de ses métabolites : le Benzo(a)Pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (PBDE).

d) Les polychlorobiphényles (PCB)

Les polychlorobiphényles (PCB) sont des composés organiques chlorés interdits depuis 1987. Du fait de leur très grande stabilité chimique, ils étaient notamment utilisés pour leurs propriétés isolantes dans les transformateurs électriques, peintures, vernis... La disparition de tous les produits en contenant a été programmée pour fin 2010 et aucun ne devrait être produit à l'heure actuelle. Les sources urbaines et industrielles de PCBs sont donc minoritaires aujourd'hui. Cependant, comme les HAP, les PCB sont hydrophobes et se fixent sur les particules. Ils sont donc largement présents dans les sédiments et de récentes études ont détecté des pics de PCB dans l'eau, montrant ainsi l'importance de l'estuaire lui-même comme source de contamination par remise en suspension des sédiments (Lachambre et Fisson, 2007).

Cette famille comprend 209 molécules apparentées répartis en 2 classes : les PCB dioxine like (PCB-dl) qui agissent comme les dioxines en se fixant sur le récepteur aryle (Ah) et les PCB non dioxine like (PCB-ndl) qui ne se fixent pas sur ce récepteur (voir plus loin « mécanismes de toxicité ». Les PCB étant généralement émis sous forme de mélange, il n'est pas nécessaire de suivre chaque congénère. 7 PCB (6 PCB-ndl et 1 PCB-dl) sont considérés comme des PCB indicateurs (PCBi) et sont utilisés pour le suivi de la pollution par les PCB.

e) Les pesticides, biocides, produits phytopharmaceutiques

Les pesticides, biocides et autres produits phytopharmaceutiques ne constituent pas une classe en eux-mêmes par des caractéristiques structurales mais par leur utilisation humaine. En effet, ces produits sont conçus et utilisés dans le but d'éliminer une certaine classe d'êtres vivants dans un cadre particulier. Les pesticides regroupent par exemple les insecticides, les fongicides et les herbicides. Outre le fait que leur utilisation a un impact direct sur les écosystèmes locaux (perturbation des chaînes trophiques...), ils peuvent se retrouver dans les cours d'eau et les estuaires par ruissellements. Certains produits biocides sont aussi directement apportés au milieu marin lors du nettoyage des circuits de refroidissement des centrales nucléaires, ou dans le cas des organoétains utilisés dans les peintures antisalissure des coques des navires, par exemple.

Ils peuvent être minéraux (cuivre de la bouillie bordelaise par exemple) ou organiques. On distingue principalement 4 familles de pesticides organiques : les organochlorés, les organophosphorés, les organoazotés (triazine) et les carbamates.

La toxicité de certains pesticides a conduit à une réglementation des usages. Par exemple, le DDT (**d**ichloro**d**iphényl**t**richloroéthane), pesticide organochloré, fait partie des substances répertoriées comme cancérigène par l'IARC (Agence internationale de recherche sur le cancer). Son utilisation a été interdite lors de la convention de Stockholm.

f) Contaminants émergents

Certaines substances pharmaceutiques se retrouvent également dans les eaux des estuaires comme l'ibuprofène, le carbamazépine et le gemfibrozil (Thomas et Hilton, 2004). Beaucoup de molécules pharmaceutiques retrouvées comme contaminants des milieux aquatiques sont des perturbateurs endocriniens et posent un important problème écologique. En effet, la reproduction est essentielle au maintien d'une espèce. Ces composés peuvent faire partie des classes déjà citées mais beaucoup sont des hormones de synthèses produites par les industries pharmaceutiques dont les plus étudiées sont le 17-beta-oestradiol, l'oestrone et l'éthinylestradiol.

Le TBT (tributylétain) est un agent biocide utilisé dans les peintures antisalissures des navires. Son utilisation a été interdite mais le contrôle du respect de cette réglementation, notamment par les petits plaisanciers, est très difficile. Ce composé est connu pour entraîner notamment une masculinisation des femelles (Imposex) chez le bigorneau perceur *Nucella lapillus*. La reproduction étant alors compromise on a assisté à une disparition de cette espèce de zones fortement contaminées comme la rade de Brest (Huet *et al.*, 2004).

Par ailleurs, une multitude de nouvelles sources de polluants émergent au fur et à mesure des avancées technologiques. Les effets toxiques des nanoparticules par exemple, définies comme des particules de taille inférieure à 100 nm de diamètre, sont de plus en plus étudiées.

E. Conclusion

La figure 5 présente les différentes contraintes exercées sur les estuaires et les interactions entre celles-ci et les paramètres structurant des estuaires. Les estuaires sont des zones présentant une forte variabilité intrinsèque et des contraintes liées au gradient de salinité et aux mécanismes hydrodynamiques mis en jeu lors de la rencontre des eaux marines et continentales. Ces estuaires sont également sujets à de nombreuses perturbations d'origine anthropique comme la modification des mécanismes hydrodynamiques liée à la construction d'infrastructures humaines qui influent sur la structure des paramètres physico-chimiques de l'estuaire, le changement climatique ou une pollution chimique.

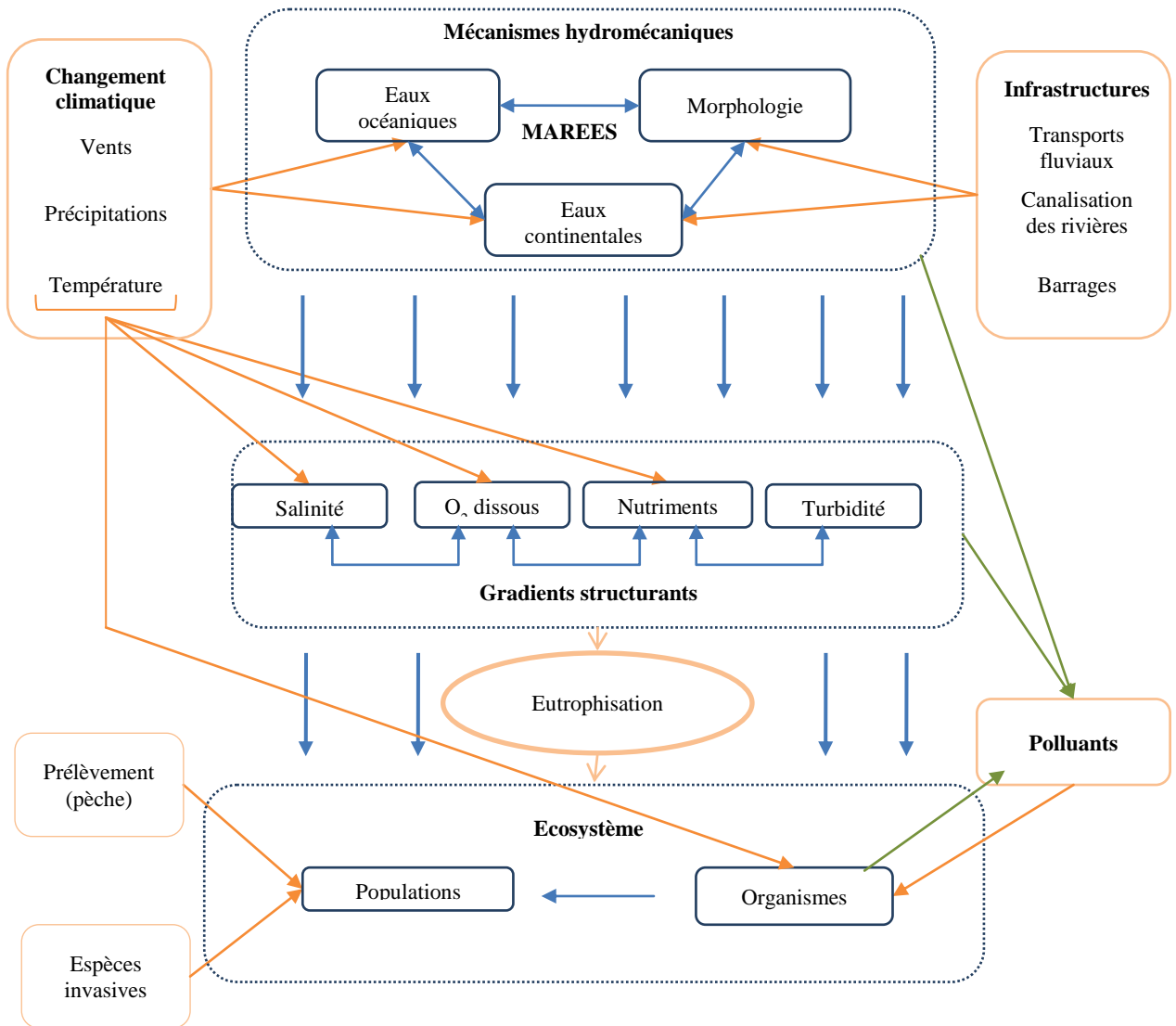


Figure 5 : Les estuaires, des systèmes naturellement contraints et soumis à de fortes perturbations anthropiques
(fonctionnement naturel en bleu, contraintes anthropiques en orange)

Toutes ces contraintes, naturelles ou artificielles, ne peuvent être considérées indépendamment les unes des autres. La réponse de l'écosystème est conditionnée par l'ensemble de ces contraintes, leurs intensités relatives et leurs interactions.

Ainsi, les polluants sont modifiés eux-mêmes lors de leur entrée dans l'estuaire. L'interface eau douce/eau de mer joue un rôle particulièrement important dans ce processus. Cette zone de forte turbidité est particulièrement importante dans les coefficients de partage entre fractions solubles des xénobiotiques et fractions adsorbées aux particules. La teneur en oxygène de cette zone va influencer sur les mécanismes d'oxydoréduction des xénobiotiques. De nombreux micro-organismes vont participer à la dégradation des xénobiotiques et des matières organiques particulières. C'est également dans cette zone qu'a lieu la spéciation des métaux. De ces processus physico-chimiques ayant lieu dans cette interface eau douce/eau

salée, va dépendre la biodisponibilité des substances pour les organismes, c'est-à-dire la capacité des substances à traverser les membranes cellulaires.

Par ailleurs, les effets des polluants combinés entre eux ou à d'autres contraintes physiques ne peuvent pas être extrapolés à partir de la connaissance des effets de chaque facteur de stress pris séparément. Des effets synergiques ou au contraire d'inhibition mutuelle peuvent en effet apparaître (Legrand *et al.*, 2006; Celander *et al.*, 2011).

De cette façon, il apparaît que l'étude de chaque paramètre et le dosage dans l'eau de chaque xénobiotique indépendamment des autres ne suffit pas pour appréhender les impacts de cette perturbation sur les organismes et les écosystèmes. Les quantifications chimiques des polluants doivent s'accompagner de l'étude de leurs effets sur les organismes et de leurs répercussions dans le cadre d'une surveillance biologique (ou bio-surveillance) à différents niveaux d'intégration (des populations aux organismes grâce à des marqueurs physiologiques, biochimiques, ... figure 5) les autres contraintes pouvant alors, par contre, jouer le rôle de facteurs confondants.

II. Effets biologiques des xénobiotiques

A. Toxicocinétique

La toxicocinétique représente l'étude du devenir des molécules dans l'organisme. Elle se déroule en 4 phases : Absorption, distribution, métabolisme et élimination.

1. Absorption

Les différentes voies d'assimilation des xénobiotiques par les organismes sont l'inhalation, l'ingestion, la diffusion cutanée. La biodisponibilité des xénobiotiques dépend de leurs propriétés physico-chimiques mais aussi des individus et des espèces. Les espèces aquatiques sont par exemple particulièrement sensibles aux contaminants dissous dans l'eau. L'absorption peut alors se faire par diffusion cutanée ou à travers les branchies. Chez les espèces benthiques, l'ingestion de particules adsorbées aux sédiments est une voie particulièrement importante de contamination.

L'absorption correspond au passage du xénobiotique dans les cellules. Elle diffère de l'adsorption qui correspond à l'adhésion du xénobiotique à la membrane de la cellule. Les toxiques peuvent être en partie adsorbés à la surface des cellules et dans le mucus extracellulaire ce qui constitue une certaine toxicorésistance. Malgré tout, une portion de la substance va être absorbée, traverser la membrane cellulaire et se retrouver dans le système

circulatoire. L'absorption peut être passive par simple diffusion des composés à travers la membrane en fonction de leur caractère hydrophobe, mais aussi active, impliquant alors des transporteurs membranaires. C'est le cas des ions mercure qui sont en compétition avec les ions Ca^{2+} pour les mêmes systèmes de transport (Blazka *et al.*, 1992). L'absorption peut aussi se faire par phagocytose.

2. Distribution

La distribution correspond à la dissémination des xénobiotiques dans l'organisme par le système circulatoire sanguin et/ou lymphatique. Chaque xénobiotique peut être pris en charge par une molécule porteuse en fonction de ses propriétés. L'albumine peut, par exemple, transporter des acides gras, des métaux (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), des antibiotiques (Bal *et al.*, 1998). On retrouve ensuite les toxiques dans différents tissus.

La diffusion peut être réduite par les barrières hématoencéphaliques, hématoplacentaires ou cérébrospinales destinées à protéger le système nerveux central ou le fœtus des toxiques.

Le foie, organe clef des mécanismes de détoxification des organismes, produit par exemple des métallothionéines, petites protéines (<10 kDa) riches en résidus cystéines et présentant donc des groupements -SH capables de se lier aux ions métalliques (Ag^+ , Cd^+ , Cu^{2+} , Hg^{2+} , HgCH_3^+ , Zn^{2+}). L'induction de la production de ces protéines peut être considérée comme un mécanisme de défense par séquestration du xénobiotique afin d'en prévenir les effets. Le rein est également riche en métallothionéines. Il peut lui aussi être le lieu d'une réabsorption des toxiques présents dans le sang.

Enfin, les tissus osseux et les cheveux peuvent aussi stocker des xénobiotiques et notamment des métaux. Ces derniers se substituent à ceux intégrés en conditions normales (Schramm, 1997).

Les tissus adipeux, quant à eux, vont concentrer un grand nombre de molécules lipophiles. En cas de fonte de la masse grasse (jeûne...), la remise en circulation de ces xénobiotiques se traduit par une augmentation de leur concentration sérique, le tissu adipeux jouant alors le rôle de source de xénobiotiques (Tremblay *et al.*, 2012).

3. Métabolisme, biotransformation

Le métabolisme ou biotransformation a pour effet de transformer les xénobiotiques en composés plus solubles et donc souvent plus facilement éliminables par l'organisme.

Cependant, certaines biotransformations peuvent aboutir à des métabolites plus toxiques pour l'organisme que le composé parent. On parle alors de bioactivation.

Les xénobiotiques sont considérés comme substrats additionnels par l'organisme ; il n'existe pas de métabolisme qui serait déclenché spécifiquement en réponse à un polluant. Certaines voies métaboliques sont privilégiées en fonction du tissu concerné et du type de xénobiotique.

Le foie est l'organe principal dans lequel les biotransformations ont lieu mais d'autres organes comme le rein présentent également des enzymes pouvant être impliquées dans la détoxification.

Le métabolisme est classiquement décrit en 2 phases : une réaction primaire (métabolisme de phase I) puis une conjugaison secondaire (métabolisme de phase II).

a) Métabolisme de phase I

Le métabolisme de phase I met en jeu principalement des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse. Les oxydations métaboliques sont les plus nombreuses. Elles regroupent un grand nombre de réactions et sont catalysées par des complexes enzymatiques présents dans les microsomes des cellules hépatiques, notamment, et regroupées sous l'appellation d'oxydases à fonctions mixtes (MFO). Parmi elles, on dénombre 221 cytochromes P450 différentes. Les cytochromes P450 (CYP) sont des hémoprotéines qui, conjointement avec la cytochrome P450 reductase (enzyme à NADPH) catalysant l'oxydation des xénobiotiques : $RH + O_2 + 2H^+ \rightarrow ROH + H_2O$ (ou R est le xénobiotique).

Parmi ces CYP, le CYP4501A est particulièrement étudié. En effet, il est induit par les HAP et les PCB-dl par l'intermédiaire du récepteur AhR (AhR : aryl hydrocarbon receptor). Cependant, la transcription d'autres CYP450 peut être induite par l'intermédiaire d'une large diversité de récepteurs (Xu *et. al*, 2005-voir paragraphe II.C.2.a).

b) Métabolisme de phase II

Le métabolisme de phase 2 consiste en la combinaison des métabolites de phase I avec des métabolites endogènes. L'union de ces 2 métabolites conduit souvent à des composés plus polaires donc plus hydrosolubles et plus facilement excrétables. Cette conjugaison secondaire a surtout lieu avec les 6 métabolites endogènes (tableau 1) : l'acide glucuronique, des acides aminés (glycine ou glutamine), le glutathion, le sulfate, l'acide acétique, des groupements méthyles.

Table 1 Métabolites endogènes impliqués dans les réactions de conjugaison secondaires et enzymes catalysant la réaction (d'après Van Coillie *et al.*, 2011)

Métabolite endogène	Enzymes catalysant la conjugaison
Acide glucuronique (AG)	UDPH-transférase
Acide aminé (glycine ou glutamine)	CoA ligase et N-Acyl transférase
Glutathion (GSH)	Glutathion S transférase
Sulfate	Sulfotransférase
Acide acétique	N-Acétyle transférase
Méthyle	Méthyle transférase

c) Bioactivation

Bien que considérées comme faisant partie des mécanismes de défense, les enzymes de phases I comme de phase II peuvent aussi induire la transformation du xénobiotique en un composé plus toxique que le composé parent : c'est la bioactivation. La propriété des xénobiotiques à être bioactivés dépend de leur structure chimique et des enzymes considérées. Ainsi, parmi les CYP450, les CYP des sous familles 1A, 1B, 2E sont plus susceptibles de participer à la bioactivation. Cette bioactivation relève souvent de la formation de composés électrophiles réactifs comme après glucuronidation (NO-glucuronides ou acyl-glucuronides) ou oxydation par les CYP en intermédiaires réactifs (Ioannides et Lewis, 2004 ; Ritter, 2000).

4. Elimination ou excrétion

L'élimination correspond à l'excrétion du toxique et/ou de ses métabolites à l'extérieur de l'organisme. Elle est parfois considérée comme la phase III du métabolisme et intervient par plusieurs voies : urinaire, hépatique (via la bile puis les fèces), pulmonaire, via de nombreuses sécrétions (larmes, sueur par exemple) ou lors de la reproduction (ponte, allaitement chez les mammifères).

Le processus d'élimination ne concerne pas les composés qui sont complètement transformés et/ou intégrés dans le métabolisme général de l'organisme ainsi que ceux qui sont accumulés dans les graisses, dans les tissus osseux et les cheveux.

Au niveau cellulaire, les transporteurs de phase III jouent un rôle important dans l'absorption, la distribution et l'élimination. On distingue les P-glycoprotéines (P-gp), les MRP (multi drug resistance-associated proteins) et les OATP2 (organic anions transporting polypeptides 2). Les P-gp sont associées au système de multidrug resistance (MDR) ou multi xenobiotic resistance (MXR) et, tout comme les MRP, utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour réaliser un transport actif à travers la membrane. Elles font donc partie de la super classe des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette transporters). Au contraire, les OATP sont une classe de transporteurs passifs (sodium et ATP indépendants) permettant le passage de composés endogènes comme exogènes, parmi lesquels on trouve des conjugués de stéroïdes, ou encore les hormones thyroïdiennes (Xu *et al.*, 2005)

B. Toxicodynamique, effets des xénobiotiques

La toxicodynamique est l'étude des effets des xénobiotiques sur l'organisme.

L'absorption de xénobiotiques entraîne dans l'organisme une cascade d'effets pouvant affecter plusieurs fonctions physiologiques, parfois même pour un seul xénobiotique. Les effets des xénobiotiques dépendent de la dose, des modes et de la durée de contamination, mais aussi des capacités de réponse de l'individu.

La toxicité d'une substance est dite aiguë si l'effet est induit dans un temps très court après administration d'une seule dose. Elle est mesurée par la DL50, c'est-à-dire la dose nécessaire pour induire la mort chez 50% de la population dans un temps normalisé (ex : 96h).

Au contraire, la toxicité chronique est le résultat d'une exposition plus durable dans le temps et dont les effets peuvent se faire ressentir à long voire très long terme. Les effets subléthaux sont mesurés par 3 principaux paramètres :

- Le NOEL (No Observed Effect Level) qui correspond à la dose la plus forte testée n'ayant pas entraîné l'effet considéré
- Le LOEL (Lowest Observed Effect Level) qui correspond à la dose la plus faible testée et ayant entraîné l'effet considéré
- La DE₁₀ ou DE₂₀ (dose efficace 50) qui correspondent aux doses entraînant l'effet considéré chez 10 ou 20 % de la population

Cependant, ces paramètres se basent sur des relations doses/réponses ne prenant pas en compte la possibilité qu'un composé ait des effets différents en fonction des doses. Par exemple, Almstrup *et al.* (2002) ont observé que les phytoestrogènes peuvent avoir un effet

inhibiteur sur l'aromatase convertissant la testostérone en 17 β -oestradiol à faible dose et un effet activateur à plus forte dose dans des cellules MCF-7 (lignée cellulaire de cancer du sein humain). Cette relation en U, ou hormesis, est bien décrite en pharmacologie et se retrouve en écotoxicologie. On peut également observer une activation à faible doses et une inhibition à doses plus élevées (Calabrese et Bladwin, 2001 ; Calabrese, 2005 ; Oberbaum *et al.*, 2005).

Par ailleurs, les effets des xénobiotiques sur les organismes peuvent aussi dépendre par exemple du stade de développement, du sexe, de la saison, du statut reproducteur.

La réponse des individus varie également en fonction des espèces mais aussi en fonction de l'âge, du sexe, du stade de développement, de la saison...

La dose létale 50 est un paramètre facile à mesurer et est utilisé comme base pour le classement des substances en « très toxique », « toxique », « nocive » (Lachambre et Cedric, 2007). Selon la théorie des traits d'histoire de vie (Stearns, 1992), la fitness des individus relève d'un compromis entre reproduction et survie notamment dans l'allocation des ressources énergétiques. Tout impact des polluants sur une fonction compromettant la reproduction ou la survie, ou encore le métabolisme énergétique, pivot de la régulation de ce compromis, est donc susceptible d'avoir des effets à des niveaux supérieurs sur la pérennité de l'espèce et l'équilibre de l'écosystème.

1. Neurotoxicité et comportement

De nombreux composés (métaux, composés organiques) ont des effets neurotoxiques. Les impacts sont particulièrement marquants puisqu'ils affectent le comportement. Ainsi, en toxicologie humaine, on a noté des problèmes d'hyper- ou d'hypo-activité, d'apprentissage, de développement de la parole ou de la perception (vue, ouïe) notamment suite à des expositions aux PCB (Kodavanti, 2005). Des résultats similaires sont observés chez les animaux (tableau 2). Chez les Poissons, on observe des modifications du comportement natatoire, du comportement de fuite et d'évitement, de la prise de proie et du comportement alimentaire alors que chez les Mollusques Gastéropodes le comportement d'enfouissement peut être modifié. En milieu naturel, ces modifications de comportement peuvent compromettre la survie de l'individu, celui-ci étant exposé à ses prédateurs, et la pérennité de l'espèce si le comportement reproducteur est affecté. Des effets contradictoires peuvent apparaître entre les études sur un même xénobiotique (mercure par exemple), en raison des différents couples temps/doses utilisées (e.g. doses environnementales, sur des longues durées vs. très forte doses sur un temps très court Smith *et al.*, 1995, 1997 ; Grippo *et al.*, 2003) ou à

des différences entre espèces. Chez les poissons, par exemple, il existe de grandes différences interspécifiques dans la sensibilité de l'acétylcholine estérase, une enzyme essentielle au fonctionnement du système nerveux (Oliveira *et al.*, 2007).

Ces modifications du comportement suite à l'exposition aux polluants ont été notamment reliées à l'action des xénobiotiques sur la neurotransmission. La transmission neuromusculaire peut être perturbée par une inhibition de l'acétylcholine estérase (AChE) notamment par les pesticides organochlorés et les carbamates (Galagani et Bocquene, 1998) mais aussi d'autres composés (Payne *et al.*, 1996). De nombreuses études ont montré un lien entre l'inhibition de l'AChE et des troubles du comportement (tableau 2). L'inhibition de l'AChE est liée à une accumulation d'Ach dans la jonction neurale et à une surstimulation du système nerveux périphérique. De même, la neurotransmission au niveau cérébral (dopamine ; GABA ; monoamineoxydase, MAO ; sérotonine, 5-HT) peut également être liée à des modifications du comportement suite à une exposition aux xénobiotiques (tableau 2) (Kodavanti, 2005).

La perturbation des voies de signalisation notamment celles liées à l'homéostasie du calcium pourrait également être un des modes d'action des xénobiotiques sur les cellules nerveuses. Ces mécanismes peuvent être similaires dans des cellules périphériques comme les érythrocytes lors d'une même exposition à un polluant. Ainsi, dans une optique d'évaluation du risque et de détection précoce de la contamination, la mesure de marqueurs sur des cellules périphériques comme les érythrocytes a été proposée (Manzo *et al.* 2001).

Table 2 : Exemples d'études montrant les impacts de différents polluants sur les neurotransmetteurs et les effets comportementaux associés chez différents poissons

Espèce	Polluant	neurotransmetteur	Comportement	Référence
<i>Channa punctata</i>	Endosulfan	Baisse 5-HT Baisse AChE	Remontée en surface	Gopal <i>et al.</i> , 1985
<i>Pimephales promelas</i>	mercure	Rien sur NAd, 5-HT, DA, ni AChE	Recherche en nourriture vitesse de capture	Grippo <i>et al.</i> , 2003
<i>Mugil cephalus</i>	mercure	Baisse 5-HT	Contrôle de la locomotion	Thomas <i>et al.</i> , 1981
<i>Fundulus heteroclitus</i>	mercure	Baisse 5-HT	Faible capacité de capture des proies	Smith <i>et al.</i> , 1995, Smith et Weiss.,

Espèce	Polluant	neurotransmetteur	Comportement	Référence
				1997
<i>Pimephales promelas</i>	plomb	5-HT, NAd,	Diverse perturbations comportementales	Weber <i>et al.</i> , 1991, 1997
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	cadmium	Forte activité 5-HT	Hiérarchie sociale non affectée	Sloman <i>et al.</i> , 2005
<i>Pimephales promelas</i> (larves)	Carbofuran molinate		Altération du comportement natatoire	Heath <i>et al.</i> , 1997
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (larves)	carbaryl	50% d'inhibition de l'AChE	Altération du comportement natatoire	Beauvais <i>et al.</i> , 2000
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Chlorpyrifos	Inhibition de l'AChE	Réduction du comportement natatoire et de la prise alimentaire	Sandahl <i>et al.</i> , 2005
<i>Corbicula fluminea</i>	Chlorpyrifos	Inhibition de l'AChE	Enfouissement ralenti	Cooper et Bidwell, 2006

5-HT : sérotonine ; AChE :acétylcholine estérase ; NAd : noradrénaline ; DA : dopamine ;

2. Immunotoxicité

Le système immunitaire est chargé de la protection de l'organisme contre les éléments extérieurs constituant le non soi (parasites, pathogènes...) et des éléments du soi susceptibles de perturber le fonctionnement de l'organisme (proliférations malignes par exemple). Les effets des polluants sur le système immunitaire les plus souvent décrits traduisent un effet immunodépresseur, qui semble réversible lorsque le contaminant est retiré de l'environnement. Cependant, dans certaines conditions (Danion *et al.*, 2012b), une activation du système immunitaire et notamment des mécanismes d'inflammation peuvent apparaître (Zelikoff, 1998).

Une dépression du système immunitaire peut tout d'abord compromettre la survie des individus en augmentant leur sensibilité aux bactéries et virus pathogènes. Hall *et al.* (1992) ont montré chez le phoque commun *Phoca vitulina* que, lors des épizooties du virus PDV (phocine distemper virus) les individus ayant succombé au virus présentaient des taux d'organochlorés plus importants que les individus ayant survécu. De même, Zelikoff *et al.* (2000) ont observé une plus forte mortalité suite à une infection expérimentale par la bactérie pathogène *Yersinia ruckerii* chez les medaka *Oryzias latipes* contaminés préalablement au

perméthrin (insecticide) par rapport aux les poissons non contaminés. Les polluants peuvent donc avoir des effets immunodépressifs qui peuvent affecter la survie des individus. Des résultats similaires ont été observés par Danion *et al.* (2012) chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* exposée au virus de septicémie hémorragique (VHSV) en milieu pollué par un herbicide, le pendiméthaline.

Par ailleurs, de nombreuses études ont relevé le développement de tumeurs en liaison avec une contamination chimique (Smith *et al.*, 1994 ; Baumann *et al.*, 1996 ; Black et Bauman, 1991). Les relations entre le développement de néoplasies et une dépression du système immunitaire sont très documentées chez les mammifères mais les informations sont rares chez les vertébrés non mammifères et les invertébrés (Robert *et al.*, 2010). Chez les mammifères, une dépression de la réponse adaptative comme de la réponse innée (interféron de type 1, Natural killer) est reliée à une induction de tumeur (Dunn *et al.*, 2005, Bui *et al.*, 2007). Si les informations sont moins nombreuses chez les vertébrés non mammifères et les invertébrés (Robert *et al.*, 2010), il reste que l'impact de la contamination chimique est avéré. L'existence de mécanismes cytotoxiques NK-like et à médiation cellulaires a été décrite chez certains poissons téléostéens comme la carpe (Nakayasu *et al.*, 2005 ; Sato *et al.*, 2008) et le poisson zèbre (Moss *et al.*, 2009). D'autre part, 60% des cancers auraient une origine génotoxique (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). Or, les effets génotoxiques de nombreux polluants sont avérés et bien décrits (voir partie suivante pour les mécanismes). Il est donc difficile, chez les organismes marins, de mesurer la part entre les tumeurs d'origine génotoxique et/ou liées à une dépression du système immunitaire.

De façon générale, le système immunitaire s'accomplit tout d'abord par la reconnaissance du non-soi, puis la réponse en elle-même permet l'élimination du pathogène ou des cellules défectueuses. Cette réponse peut être spécifique (acquise), et nécessiter une première exposition au pathogène, ou aspécifique (innée), à médiation humorale ou cellulaire. Des différences sensibles existent entre le système immunitaire des vertébrés et celui des invertébrés, qui repose principalement sur les défenses innées (Galloway et Depledge, 2000).

Les impacts des polluants sur la réponse innée sont particulièrement étudiés et peuvent s'exercer à tous les niveaux (Bols *et al.*, 2001). Les polluants peuvent agir sur la sécrétion de mucus, première barrière physique empêchant la pénétration des pathogènes dans l'organisme. Celui-ci contient des agents antimicrobiens et des facteurs humoraux également impliqués dans la réponse innée interne comme le complément ou le lysozyme, une enzyme

lysant la paroi des bactéries à gram-positif. De même, des protéines telles que les interférons, agents impliqués dans la défense antivirale ou les protéines C réactives (CRP), impliquées dans la régulation de la phagocytose et l'activation de la cascade du complément peuvent subir l'impact des polluants. La phagocytose est un mécanisme multi-étape (reconnaissance par chimiotactisme, adhésion, internalisation, digestion) exercé principalement par les monocytes macrophages aboutissant à la digestion du pathogène par formation d'espèces réactives de l'oxygène.

Le complément peut à la fois agir directement sur la lyse des pathogènes ou participer au recrutement des macrophages dans le cadre de la réponse innée comme à celui des lymphocytes B qui initient la réponse spécifique. Ainsi, les systèmes aspécifiques et spécifiques sont en fait deux voies de réponse qui collaborent. Dans le cadre de la réponse spécifique, les anticorps permettent la reconnaissance de l'agent étranger. De nombreux facteurs humoraux (interleukine, cytokines, TNF) sont produits par les lymphocytes et autres cellules immunitaires. Ils assurent également la communication entre ces cellules ainsi que la régulation de cette réponse. Les facteurs humoraux tels que les natural killer (NK) peuvent aussi avoir une activité cytotoxique.

Les modes d'action des polluants sur le système immunitaire sont mal connus. Certains, comme les métaux, pourraient avoir une activité cytotoxique sur les leucocytes (lymphocytes ou monocytes macrophages) par augmentation du Ca^{2+} intracellulaire ou par une induction d'espèces réactives de l'oxygène (Bols *et al.*, 2001).

Par ailleurs, le système immunitaire peut également subir des variations saisonnières, liées à la croissance ou au développement gonadique (Auffret et Oubella, 1994 ; Renwratz, 1990). De même, il existe une différence inter-sexe dans la réponse immunitaire en conditions normales comme lors d'une contamination chimique (Gaillard et Spinedi 1998). En effet, les hormones stéroïdes semblent jouer un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire (Miller et Hunt, 1996 ; Gaillard et Spinedi, 1998). De cette façon, de plus en plus d'études cherchent à déterminer les effets des perturbateurs endocriniens sur le système immunitaire et leurs mécanismes (Ahmed 2000 ; Chalubinski et Kowalski, 2006).

3. Perturbation endocrinienne

De nombreux polluants peuvent compromettre la reproduction à travers des mécanismes très différents. Par exemple, les mécanismes de génotoxicité (expliqués dans la partie suivante) peuvent être à l'origine de mutations transmises à la descendance ou d'une

tératogénicité compromettant la survie de l'embryon. Cependant, les polluants les plus étudiés pour leurs effets sur la reproduction sont les perturbateurs endocriniens. Ils sont définis comme des agents pouvant altérer le développement ou la reproduction par un effet direct ou indirect sur les axes hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien ou hypothalamo-hypophysaire-gonadique des vertébrés (Ankley *et al.*, 2009).

Leurs effets peuvent se traduire au niveau phénotypique par une modification du sexe des individus par rapport à leur sexe génétique : intersex et ovotestis (Allen *et al.*, 1999 ; Hashimoto *et al.*, 2000 ; Kirby *et al.*, 2004 ; Minier *et al.*, 2000), imposex (Bryan *et al.*, 1986, Gibbs et Bryan, 1986).

La maturation des gamètes (oogenèse, gamétogenèse) peut également être altérée. Une augmentation de la VTG (vitellogénine) est ainsi corrélée à des malformations testiculaires (Gill *et al.*, 2002, Lye *et al.*, 1998), une augmentation de malformation d'oocytes (Lye *et al.*, 1998), des anomalies du sperme (Gill *et al.*, 2002) ou de la motilité des spermatozoïdes (Kleinkauf *et al.*, 2004) ou encore une augmentation des lésions hépatiques ou rénales (Simpson *et al.*, 2000). Scott *et al.* 2006 ont montré que l'augmentation de VTG pouvait exercer un rétrocontrôle négatif sur la production de stéroïdes sexuels (E2, 11-KT). De nombreuses études montrent en effet une diminution d'hormones stéroïdiennes en réponse à la pollution (Munkittrick *et al.*, 1991 ; Ankley et Giesy, 1998 ; McMaster *et al.*, 2001). Les effets des perturbateurs endocriniens dépendent également du stade de vie auquel l'individu y est exposé : les stades de développement précoces sont particulièrement sensibles, notamment en raison de la mise en place des caractères sexuels secondaires (Tyler *et al.*, 1999 ; Van Aerle *et al.*, 2002).

Classiquement, on considère que les perturbateurs endocriniens agissent par mimétisme sur les voies physiologiques des axes HPG ou HPT ou par inhibition ou activation d'enzymes impliquées dans la synthèse des hormones stéroïdiennes naturelles (Arcand-Hoy et Benson 1998, figure 6). Ils peuvent aussi agir en se liant directement avec les récepteurs aux œstrogènes (ER) ou aux androgènes (AR) dans les organes cibles (Ankley *et al.*, 2009). Cependant, de plus en plus d'études montrent une action également sur les récepteurs nucléaires régulateurs du métabolisme des xénobiotiques et des hormones stéroïdiennes comme les RXR (voir paragraphe II.C.2.a ; Tabb et Blumberg, 2006).

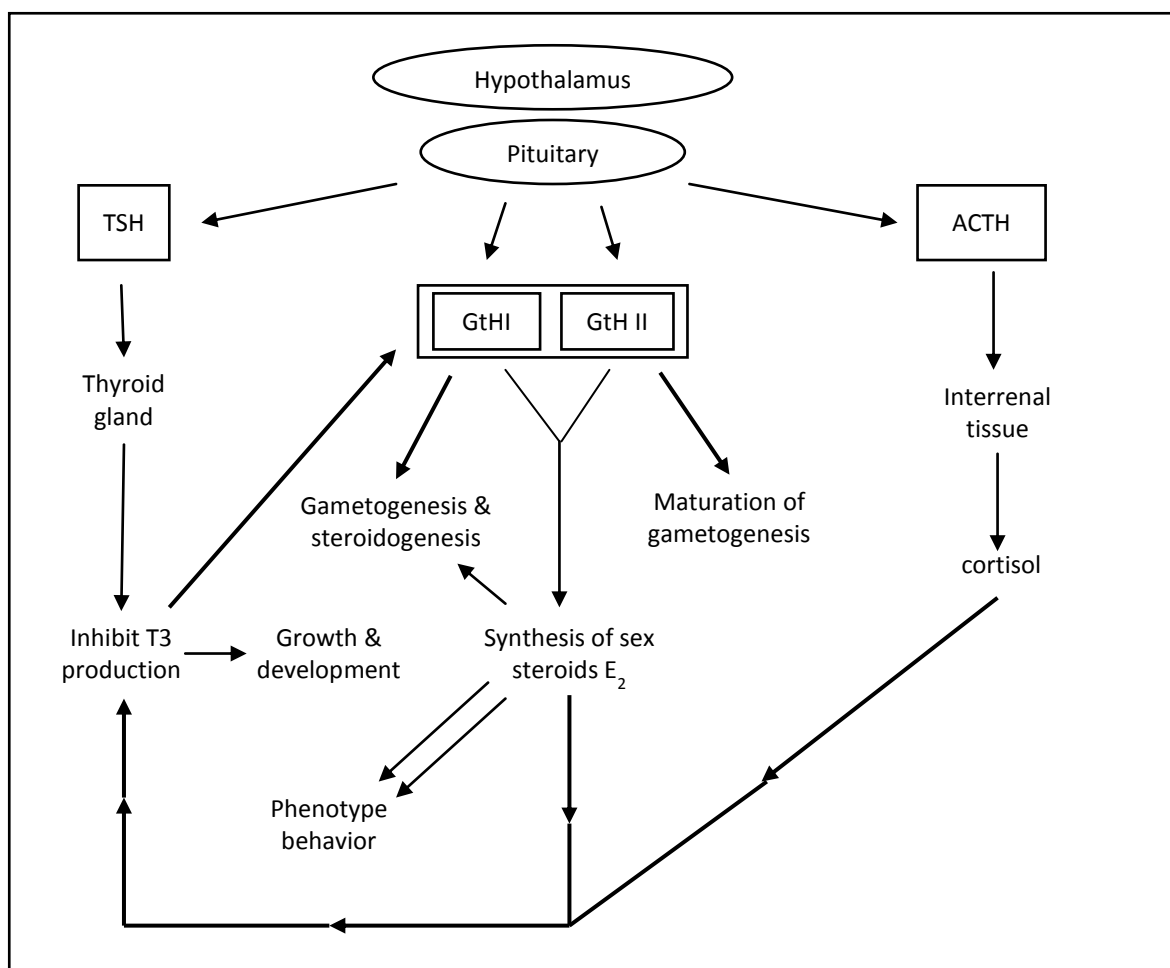


Figure 6 : Interrelations entre les systèmes neuro endocrines (d'après Arcand-Hoy et Benson, 1998). Les hormones gonadotropiques, les hormones thyroïdiennes et adrénocorticotropiques (ACTH), sont sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA). Les gonadotropines (GtHI et GtHII) ont un effet sur la synthèse des stéroïdes (E₂), qui régulent eux même la reproduction, le phénotype et le comportement. La conversion des hormones thyroïdiennes T4 en T3 peut être inhibée par une concentration plasmatique élevée en E₂ et cortisol (ligne épaisses). La thyroxine T4 peut augmenter l'effet des gonadotropines comme le développement des oocytes et leur maturation (ligne épaisse). TSH : thyroid-stimulating-hormone ; GtH : gonadotropine ; ACTH : adrenocorticotropine ; E₂ : oestradiol ; T4 : thyroxine ; T3 : triiodothyronine.

Ces composés perturbateurs endocriniens peuvent altérer d'autres fonctions que la reproduction comme la réponse au stress par dérégulation de l'axe HPA, le système immunitaire ou le métabolisme énergétique. Arsenescu *et al.* (2008) ont montré que le PCB-77, composé lipophile, entraîne chez la souris l'augmentation de la différenciation des adipocytes, de l'expression de cytokines pro-inflammatoires et l'expression du PPARgamma, promoteur de la régulation de l'homéostasie énergétique. De même, la liaison des organoétains sur les hétérodimères RXR/PPARγ entraîne, par exemple, une augmentation de la masse grasse par une augmentation de la transcription des gènes induisant un stockage des acides gras, l'adipogenèse et une répression de la transcription des gènes induisant la lipolyse.

Les effets obésogènes de polluants comme les PCB (Arsenescu *et al.*, 2008, Dirinck *et al.* 2011) ou les organoétains (Grun et Blumberg, 2006) sont de plus en plus étudiés en raison des conséquences sanitaires sur les populations humaines et pourraient être considérés comme un mécanisme de défense de l'organisme face au polluant, une augmentation de la masse grasse permettant de stocker une quantité plus importante de xénobiotiques lipophiles non excrétés.

4. Métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique peut donc être modifié directement par les polluants. Par ailleurs, les compromis dans l'allocation des ressources énergétiques entre survie et reproduction sont primordiaux pour la fitness des individus. De nombreuses études ont noté un impact de la contamination sur le métabolisme énergétique. Les populations de flet européen *Platichthys flesus* vivant dans des sites contaminés présentent des taux de croissance, des indices de condition et un rapport RNA/DNA (marqueur de l'activité de synthèse) plus faibles que ceux vivant dans des sites non contaminés (Amara *et al.*, 2009). Kerambrun *et al.* (2012) ont montré par exemple que le taux de croissance, différents indices de condition, le rapport RNA/DNA et le stockage des lipides (rapport TAG/ST entre les triacylglycérols (TAG), lipides de réserves métabolisables pour la production d'énergie et les stérols, lipides de structure et notamment constituant de la membrane cellulaire) sont plus faibles chez les turbots juvéniles *Scophthalmus maximus* exposés à des sédiments contaminés (métaux, HAP notamment) que chez les témoins.

Par ailleurs, Sherwood *et al.* (2000) ont montré un taux de cortisol plasmatique élevé, et un taux de croissance 3 fois plus faible chez les perchaudes *Perca flavescens* ayant grandi dans un lac contaminé par les métaux par rapport aux perchaudes des sites témoins. L'étude du taux d'alimentation montre que cette différence ne vient pas d'une différence dans la consommation, mais dans l'efficacité de conversion ou d'une augmentation de la dépense énergétique.

La modification du métabolisme est considérée comme la phase secondaire de la réponse générale au stress. En effet, l'augmentation du cortisol et des catécholamines entraîne une augmentation de la glycolyse, du catabolisme des protéines et de la lipolyse (Pankhurst, 2011) et une modification du comportement (Landys, 2006). Tierney *et al.* (2011) ont montré, chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, une corrélation entre l'augmentation de la glycémie et de la concentration en cortisol plasmatique et une exposition de 96h à un mélange de pesticide.

Par ailleurs, Bains *et al.* (2004) ont observé sur des cultures d'hépatocytes de truite arc-en-ciel une augmentation de la consommation en oxygène corrélée à la dose de pyrène appliquée et à la concentration en métabolites produits. Au contraire, le taux de respiration des mitochondries isolées n'est pas modifié par l'exposition au pyrène. Ainsi, l'augmentation générale de la consommation en oxygène des hépatocytes ne peut pas être liée à une action directe du pyrène sur la chaîne respiratoire mitochondriale mais au coût direct des mécanismes de détoxification. Au niveau cellulaire, les mécanismes de biotransformation, notamment en liaison avec une activité de synthèse protéique importante, semblent donc avoir un coût énergétique impliquant une réorganisation métabolique (Couture *et al.*, 2003, Nault *et al.*, 2012).

Au niveau de l'organisme, une augmentation du taux métabolique standard, mesure de la consommation en oxygène, accompagnée d'un taux de croissance moindre est observée en réponse à une pollution chimique chez de nombreux taxa de vertébrés et invertébrés (Rowe 2001). En métabolisme aérobie, le pyruvate, produit de la glycolyse, est oxydé en H_2O et CO_2 au cours de la respiration. On distingue 3 phases : la production d'acetyl-CoA, le cycle de Krebs permettant l'oxydation de l'acetylCoA et la production de pyridines réduites ($NADH_2$, $FADH_2$), et la chaîne respiratoire qui permet la production d'ATP. Lors de la respiration aérobie, les électrons sont transférés aux cofacteurs NADH, H^+ , puis finalement au dioxygène, accepteur final d'électrons. Le dioxygène permet donc la régénération de cofacteurs sous leur forme oxydée.

En absence de dioxygène, les électrons sont transférés à d'autres composés comme le pyruvate ce qui entraîne la formation d'acide lactique (fermentation lactique). Cette réaction ne permet la production d'ATP qu'au niveau du substrat et permet à la glycolyse de se dérouler quantitativement (en réoxydant le $NADH_2$ produit). Elle est catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH).

L'activation de ce métabolisme anaérobie en réponse au stress est souvent observé. De nombreuses études ont mesuré une augmentation de l'activité de la LDH (Vieira *et al.*, 2008, 2009) ou du lactate plasmatique (Oliveira *et al.*, 2011 ; Pacheco *et al.*, 2001) sous l'effet d'un stress chimique et en association avec une augmentation du taux de cortisol.

C. Mécanismes d'action et de réponse

1. Mécanisme général de la réponse au stress

a) Au niveau physiologique : L'axe corticotrope

En cas de stress, l'organisme adopte une réponse médiée notamment au niveau hormonal afin de maintenir l'équilibre (Selye, 1976). Chez les vertébrés, cette réponse au stress est décrite en trois phases (figure 8) : réponse primaire hormonale et notamment corticotrope, réponse secondaire métabolique (augmentation du rythme cardiaque, modification du métabolisme énergétique), et une réponse tertiaire pouvant impliquer différentes fonctions comme le système immunitaire ou la reproduction. Elle correspond donc au premier mécanisme de régulation des compromis entre survie et reproduction notamment dans l'allocation des ressources énergétiques.

Les hormones corticostéroïdes, associées aux catécholamines (adrénaline et noradrénaline) sont les effecteurs de la réponse à court terme au stress. La sérotonine (5-HT) joue un rôle important dans la régulation de la production de cortisol, par l'intermédiaire du cortisol releasing factor (CRF) ou de l'adrenocorticotropine pituitaire (ACTH), et son précurseur pro-opiomelanocortine (POMC) (Bhattacharya, 2001).

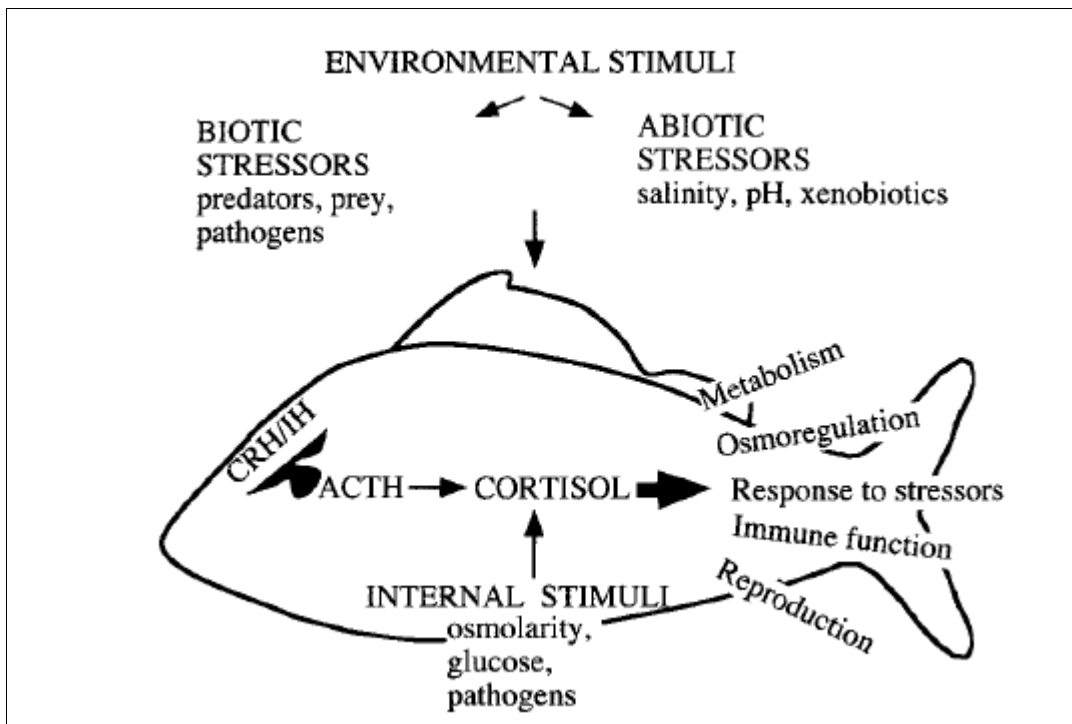


Figure 7 : Le cortisol est le pivot de la réponse primaire au stress (d'après Hontela *et al.*, 1998)

Di-Poi *et al.* (2007) ont montré chez le bar *Dicentrarchus labrax* une corrélation entre un stress social (densité de poissons dans les bacs) et un niveau élevé de cortisol circulant, et un rapport 5HIAA/5-HT élevé (ou 5HIAA est l'acide 5-hydroxyindolacétique, métabolite de la sérotonine 5-HT). De même, on observe une augmentation de cortisol circulant en réponse à un stress de capture, thermique, hypoxique ou le pH (Portz *et al.*, 2006).

Une exposition à court terme des poissons à une grande variété de contaminants tels que les métaux (Teles *et al.*, 2005), les effluents d'usine à papier (Teles *et al.*, 2003), des PAH (Oliveira *et al.*, 2007) ou des fractions solubles de pétroles (Thomas et Rice, 1987) peuvent entraîner une augmentation du taux de cortisol plasmatique. Gesto *et al.* (2009) ont montré une augmentation des ratios 5HIAA/5HT et DOPAC/DA (ou DOPAC est l'acide 3,4-dihydroxyphenylacetic, métabolite de la dopamine DA) suite à une exposition au β -naphtoflavone après 72 heures d'exposition.

Au contraire, une diminution de la concentration plasmatique en cortisol a été observée à très court terme en réponse à des expositions à des résines acides et au naphthalène (Teles *et al.*, 2003), ou aux particules solubles du pétrole (Pacheco et Santos, 2001). Dans ces études, néanmoins la concentration plasmatique en cortisol augmente après 48 h ou 6 jours, respectivement, de même que les concentrations plasmatiques en glucose et en lactate, marquant une modification du métabolisme. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une perturbation directe du système endocrine par le polluant. Après un temps d'acclimatation, une réponse au stress engendrée par la dérégulation de l'homéostasie du poisson (mécanismes de détoxification,...) pourrait alors avoir lieu.

Par ailleurs, la capacité à augmenter le cortisol en réponse à un stress ponctuel (stress de capture) est utilisée comme un marqueur de la compétence physiologique. Hontela *et al.* (1995) ont montré, chez le grand brochet *Esox lucius* et la perchaude *P. flavescens*, que les individus ayant subi une contamination chronique environnementale à long terme présentent des faibles taux de cortisol plasmatique et une incapacité à répondre par une augmentation de ce cortisol plasmatique à un stress de capture. Cette incapacité est corrélée à des modifications histologiques (large noyau et larges espaces intercellulaires) des cellules stéroïdogéniques pituitaires. De plus, des résultats similaires ont été observés chez la salamandre *Necturus maculosus* soumise à une pollution chronique dans plusieurs sites du fleuve St Laurent (PCB et pesticides organochlorés - Gendron *et al.*, 1997). De même, une injection d'ACTH

n'entraîne pas d'augmentation du cortisol plasmatique chez la salamandre (Gendron *et al* 1997), ou chez l'amphibien *Bufo terrestris* soumis à une pollution chronique de produits de combustion (Hopkins *et al.*, 1999).

Ainsi, la pollution chronique pourrait être à l'origine d'un dysfonctionnement du système de réponse au stress corticotrope, soit par une sur-stimulation et un épuisement de ce système à long terme, soit par une perturbation endocrine directe sur les différentes cellules et mécanismes impliquées (Hontela, 1998).

L'augmentation des corticostéroïdes est à l'origine d'une cascade d'effets secondaires métaboliques, comme une augmentation de la néoglucogenèse, du catabolisme des protéines, et de la lipolyse (Pankhurst, 2011). Des effets à long terme sur le rythme cardiaque, le système immunitaire ou l'osmorégulation peuvent également apparaître (Hontela, 1998). La réponse au stress peut être déclenchée directement par le polluant comme facteur de stress ou indirectement, lorsque le polluant impacte une fonction physiologique précise (métabolisme énergétique, reproduction...) et déséquilibre l'homéostasie de l'organisme. Elle peut également subir un impact direct des polluants et être elle-même dérégulée. La connaissance fondamentale des modes d'actions des xénobiotiques est donc nécessaire pour comprendre les effets observés sur les organismes.

b) Au niveau moléculaire : Heat shock proteins (HSP)

Au niveau cellulaire, la réponse générale au stress implique les protéines de stress, parmi lesquelles les protéines de choc thermique (HSP, « heat shock proteins ») en raison de leur découverte dans le cadre de la réponse à l'exposition à une température subléthale chez les drosophiles (Ritossa, 1964). Les HSP sont des protéines très conservées d'une large famille et sont regroupées en fonction de leurs poids moléculaires (HSP70 : 70 kDa, HSP90 : 90 kDa, etc.). Elles ont un rôle de chaperonnes et donc une capacité de réparer des protéines ou de favoriser leur élimination lorsque la réparation est trop coûteuse énergétiquement (Arrigo, 2005).

Parmi les protéines de cette famille certaines sont exprimées constitutivement et non spécifiquement en réponse au stress (HSC : Heat shock cognate). Lors d'un stress, ces protéines constitutives sont recrutées et la synthèse de protéines de stress supplémentaires est induite. Ainsi, leur induction ne se limite pas à la réponse au stress thermique mais s'étend à toute situation pouvant déstabiliser la structure des protéines parmi lesquelles l'exposition aux xénobiotiques (Iwama *et al.*, 1998, 1999; Monari *et al.*, 2011).

L'induction des HSP est réversible mais durable dans le temps. Ainsi, une préexposition à un stress induisant une production de HSPs entraîne une tolérance à des stress ultérieurs. Un prétraitement à la chaleur induit ainsi une tolérance à des doses normalement élevées de malathion chez les daphnies *Daphnia magna* (Bond et Bradley, 1997) ou au Cd chez la moule (Tedengren *et al.*, 2000). Cependant, pour des espèces vivant dans des milieux soumis à de fortes variabilités des contraintes naturelles (température, salinité...) cette tolérance peut ne pas se retrouver (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). La synthèse de HSP ne peut augmenter indéfiniment et le coût de synthèse peut dépasser le bénéfice (Eckwert *et al.*, 1997 ; Pyza *et al.*, 1997).

Les structures protéiques présentant des défauts de repliements sont détectées par le complexe HSP90/HSC70, protéines constitutives dans la cellule. Ce complexe libère alors le facteur de transcription HSF-1 qui est alors modifié (phosphorylé) et migre vers le noyau où il se lie aux motifs HSE (Heat Shock Element) localisés dans la région promotrice des gènes codant pour les HSP. La grande quantité de HSP ainsi synthétisée permet de replier correctement les protéines défectueuses et d'exercer une rétroaction négative sur HSF-1 (figure 8). D'autres mécanismes inducteurs de HSPs sont étudiés. Cette réponse pourrait être liée à la réponse neuroendocrine au stress (Iwama *et al.*, 1999), à des changements de potentiel redox dans la cellule (Voellmy, 1996). Les cascades de régulation impliquant les mitogen-activated protein kinases (MAPK) ainsi qu'une augmentation de calcium intracellulaire, et la stimulation d'enzymes comme les phospholipases C et A2 (Calderwood *et al.*, 1993 ; Kiang et McClain, 1993) pourraient affecter la phosphorylation de HSF1 et donc la production de HSPs (Iwama *et al.*, 1998).

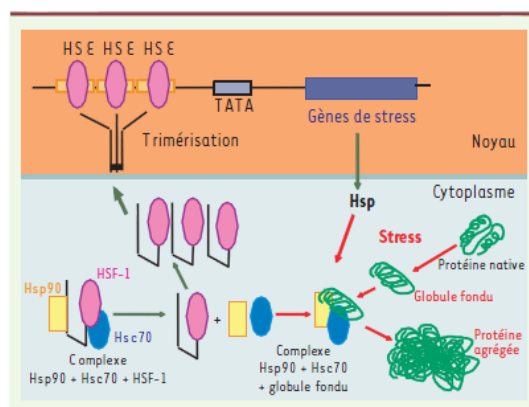


Figure 8 : Voie d'activation de la transcription des HSP (d'après Arrigo, 2005). HSE : heat shock element ; HSP : Heat shock protein ; HSF-1 : Heat shock factor.

2. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse au stress chimique

De façon générale, le mode d'action des xénobiotiques au niveau cellulaire n'est pas spécifique de la réponse aux polluants, mais fait intervenir des voies de signalisation et des récepteurs existants de façon endogène. La réponse cellulaire peut avoir lieu directement en réponse aux xénobiotiques, ou secondairement à la déstabilisation de paramètres physico-chimiques comme un stress oxydant.

a) Voies dépendantes des récepteurs nucléaires

Les xénobiotiques lipophiles vont activer des voies de signalisation en se liant à des récepteurs nucléaires ou cytoplasmiques, cibles habituelles des hormones lipophiles. Les PXR (pregnane X receptor), CAR (constitutive androstane receptor) sont des ligands endogènes des stéroïdes alors que les RXR (retinoid X receptor) se lient à l'acide 9-cis-retinoïc, métabolite de la vitamine A (Xu *et al.*, 2005) par exemple. L'activation de ces récepteurs puis leur translocation dans le noyau permet d'activer la synthèse de nombreux gènes en réponse aux xénobiotiques et notamment des gènes impliqués dans la détoxification (phase I et phase II) ou l'élimination (phase III) (Xu *et al.*, 2005).

A titre d'exemple, les perturbateurs endocriniens sont connus pour se lier aux récepteurs aux œstrogènes, aux récepteurs aux androgènes, aux récepteurs aux cholestérols par mimétisme en fonction de leur structure et de leur affinité pour ses récepteurs. De plus en plus d'études montrent une action également sur les récepteurs nucléaires régulateurs du métabolisme des xénobiotiques et des hormones stéroïdiennes comme les SXR/RXR (Steroid or xenobiotic receptors/ rodent pregnane X receptor) ou les CAR (Constitutive Androstane Receptor) exprimés dans le foie et les intestins et induisant la production de CYP450, d'enzymes de conjugaison et de transporteurs (P-gp, MRP...) (Tabb et Blumberg, 2006). Une implication des AhR dans la régulation des fonctions endocrines liées à la reproduction en conditions normales et pouvant donc être perturbées par une contamination chimique (notamment PCB-dl) est également étudiée (Pocar *et al.*, 2005).

Par ailleurs, l'un des mécanismes les plus étudiés est celui du AhR. En effet, les composés organiques comme les HAPs ou les PCB-dl se lient à un complexe formé par le récepteur aux aryles hydrocarbures (AhR : aryl hydrocarbon receptor) et la protéine de choc thermique HSP90 ce qui entraîne la dissociation de ce complexe. Le nouveau complexe AhR/xénobiotique s'associe alors au transporteur nucléaire de récepteur aux aryles hydrocarbures (ARNT) qui le transloque dans le noyau. Ce nouveau complexe va alors se

fixer sur une région de l'ADN situé dans le promoteur de gènes régulés par les xénobiotiques (XRE : xenobiotic regulatory element). La transcription du gène CYP1A (entre autres) peut alors être activée et la synthèse de protéine CYP1A augmente (Guengerich, 1993). Le récepteur AhR constitue donc une des clefs de la régulation des mécanismes de détoxification des composés organiques.

Cependant, il pourrait également jouer un rôle dans l'induction d'autres mécanismes physiologiques comme l'immunité (Esser *et al.*, 2009), la reproduction à travers l'axe HPG (hypothalamo-pituitaire-gonadique ; Pocar *et al.*, 2005). Par ailleurs, le récepteur AhR pourrait participer à la régulation des voies de signalisation cellulaire comme les voies de phosphorylation par activation de protéines kinases ou réabsorption de Ca^{2+} (Pocar *et al.*, 2005 ; Marlowe et Puga, 2005 ; Puga *et al.*, 2009).

b) Voies de signalisations intracellulaires et phosphorylations

Les hormones ne pouvant pas traverser la membrane cytoplasmique comme les catécholamines (Ad, NAd) agissent sur des récepteurs membranaires. Les voies de signalisation alors mises en œuvre font intervenir des seconds messagers amplifiant la réponse. Les kinases jouent alors des rôles pivots dans cette réponse. Certains xénobiotiques peuvent également agir à travers ses voies de signalisation.

La phosphorylation, addition d'un groupement phosphate à une protéine (souvent sur les résidus Sérine, thréonine ou tyrosine) par une kinase, est un des principaux modes de régulation de l'activités des protéines. Elle permet l'activation (ou inactivation) des enzymes ou des facteurs de transcription. Les voies de signalisation intracellulaires font intervenir de nombreuses protéines kinases et sont impliquées dans la transduction des signaux de stress comme des stress osmotiques, l'anoxie, la congélation, ou la chaleur mais aussi les xénobiotiques (Cowan et Storey, 2003). Les kinases sont régulées par les hormones, les cytokines mais aussi par la teneur intracellulaire de Ca^{2+} , dans les voies dépendantes de la calmoduline (CAM).

Ainsi, Behra (1993) a montré chez la truite arc en ciel *Oncorhynchus mykiss*, la moule *Mytilus sp.* et l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*, que l'activation des voies de phosphorylation dépendantes de la calmoduline par le Cd et le Zn ne peut se faire qu'en présence de Ca^{2+} alors que le plomb est capable d'activer cette voie en l'absence de Ca^{2+} . La

teneur en calcium est donc bien un élément important de la régulation de la réponse aux xénobiotiques.

Par ailleurs, les mitogen activated protein kinases (MAPK), protéines conservées au cours de l'évolution (Böhm *et al.*, 2002 ; Muller *et al.*, 2002) sont impliquées dans un grand nombre de réponses cellulaires : transcription de gènes, organisation du cytosquelette, croissance cellulaire, apoptose et réponse au stress (Kyriakis 1999). Des études ont montré leur activation en réponse aux métaux lourds (Kefaloyianni *et al.*, 2005 ; Burlando *et al.*, 2006 ; Canesi *et al.*, 2001), à une contamination bactérienne (Canesi *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2006) à des hormones (Canesi *et al.*, 2004 ; 2006), ou à des composés dioxin like comme le TCDD (el-Sabeawy *et al.*, 1998 ; Tan *et al.*, 2002). Chatel *et al.* ont montré chez l'éponge *Suberites domuncula* (Chatel *et al.*, 2011) et chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Chatel *et al.*, 2010) que l'activation de 3 MAPK (p38, ERK et JNK) dépend du polluant utilisé (TBT, ou fraction soluble de pétrole), des doses utilisées, des temps de contamination mais aussi de la saison et des sites d'origine des individus ce qui suggère une influence des autres contraintes physique du milieu (salinité...).

Par ailleurs, Tan *et al.*, 2002 ont montré les liens étroits entre l'activation des MAPK par le TCDD (composé dioxin like) et l'activité du récepteurs AhR sur des lignées cellulaires de souris hepa-AhRDtk-Luc3 présentant un domaine rapporteur répondant au complexe AhR/ARNT sur le gène du CYP4501A. En effet, en présence d'inhibiteurs de ERK ou JNK/p38, 3 MAPK, l'activité de AhR a été partiellement supprimée ainsi que l'induction du CYP4501A. De même, l'inhibition simultanée de JNK et ERK a entraîné la suppression quasi-complète de l'induction de CYP4501A. Il semblerait ainsi que la phosphorylation de AhR et l'implication de ces différentes voies de phosphorylation participent à l'activation de AhR et à l'induction de la détoxification. Les voies de signalisation intracellulaires et celles impliquant les récepteurs nucléaires seraient donc complémentaires dans la réponse aux xénobiotiques.

De même, la transcription d'enzymes de phases II par le facteur de transcription Nrf2 est régulée par la phosphorylation de ce facteur (Xu *et al.*, 2005). Cependant, dans certains types cellulaires, des espèces électrophiles, inducteurs forts d'enzymes de phase II comme les espèces réactives de l'oxygène ou le Cd, n'induisent pas de modification de la synthèse de ARNm de Nrf2, mais régulent son accumulation en atténuant son ubiquitination et sa dégradation par le proteasome (Alam *et al.*, 2003, Nguyen *et al.*, 2003, Stewart *et al.*, 2003).

c) Stress oxydant

Une réaction d'oxydoréduction est un échange d'électron(s) entre un accepteur (oxydant) et un donneur (réducteur). Ces réactions sont très importantes physiologiquement, et notamment dans la mitochondrie, lieu de la respiration cellulaire (phosphorylation oxydative). Cependant, la réduction de l' O_2 au cours de la chaîne respiratoire peut être incomplète. En conditions normales, 1-5% de l'oxygène échapperait ainsi à cette oxydation et donnerait naissance à des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Ricci *et al.*, 2003). Les ROS peuvent être des espèces radicalaires (présentant un électron libre sur leur couche orbitale externe) ou des molécules à grand pouvoir électrophile : le radical hydroxyle OH^\bullet , le radical superoxyde O_2^\bullet , les peroxydes organiques ROO^\bullet , l'oxyde nitrique NO^\bullet , et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ... La production de ROS a lieu en conditions normales et la cellule dispose d'un arsenal de défenses anti-oxydantes afin de limiter les réactions en chaîne. Parmi ces défenses, on distingue les mécanismes enzymatiques impliquant souvent le NADPH/NADP⁺ comme cofacteur (figure 9), des mécanismes non enzymatiques impliquant des molécules de faibles poids moléculaires, hydrosolubles comme le β -carotène, l'ascorbate (vitamine C), ou liposolubles comme l' α -tocopherol (vitamine E).

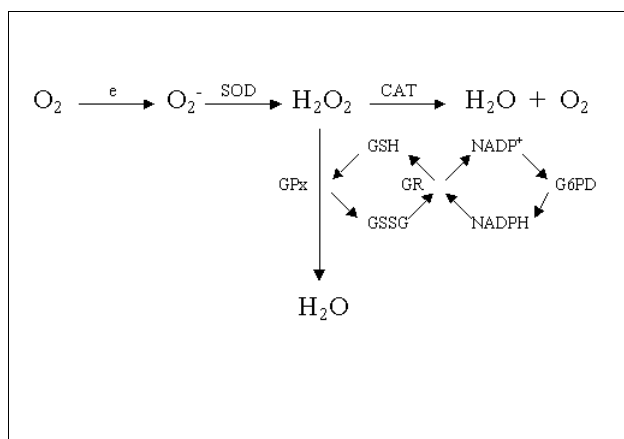


Figure 9 : Mécanismes enzymatiques de défenses anti-oxydantes. CAT : catalase ; SOD : superoxyde dismutase ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; GPx : glutathion peroxydase ; GR : glutathion reductase ; G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase

Le stress oxydant naît d'un déséquilibre de la balance entre les molécules pro-oxydantes et les défenses naturelles anti-oxydantes. De nombreux paramètres environnementaux comme l'hypoxie, la température ou la pollution chimique (métaux, composés organiques et notamment les quinones) sont à l'origine d'un stress oxydant pouvant

se traduire par des dommages oxydatifs (Livingston, 2003). De nombreuses études ont montré *in vitro* et *in vivo* l'implication de flavoprotéines NAD(P)H dépendantes dans la production de ROS et notamment du radical OH^\cdot en réponse à des xénobiotiques (Livingstone *et al.*, 2000 ; Lemaire *et al.*, 1994, 1997; Peters *et al.*, 1996). Ces résultats montrent ainsi le rôle des enzymes de détoxification comme les CYP-monooxygénases dans la génération de ROS. Par ailleurs, la contamination par les métaux est susceptible de générer des espèces réactives de l'oxygène par la réaction dérivée de Fenton : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$ (Liochev, 1999), mais aussi de réduire les capacités anti-oxydantes de la cellule (Ercal *et al.*, 2001). En effet, le processus par lequel les métaux sont pris en charge directement par le glutathion et excrété de la cellule entraîne une déplétion des réserves en GSH de la cellule et donc une diminution de ces capacités anti-oxydantes (Quig, 1998). De plus, certains métaux ont la propriété d'inactiver les enzymes en se liant au groupe sulfhydryle des protéines (mercure, cadmium, plomb, arsenic) ou en remplaçant les cofacteurs métalliques de ces protéines et notamment le zinc (Quig, 1998). Par ailleurs, les enzymes anti-oxydantes superoxyde dismutase (SOD a Cu/Zn, Mg, Fe) sont des métalloprotéines et la catalase une hémoprotéine (à un atome de fer).

Par exemple, Otitloju et Olagoke (2011) ont observé chez le poisson chat nord-africain *Clarias gariepinus* une augmentation de la quantité de lipides peroxydés (MDA, malondialdehyde) accompagnée d'une diminution des activités enzymatiques anti-oxydantes (SOD, CAT, GST : glutathion-S-transférase) après 28 jours de contamination aux HAP. Cependant, Van der Oost (2003) a montré que les effets des polluants sur l'activité enzymatique anti-oxydante et les dommages occasionnés varient beaucoup selon les études, ce qui pourrait indiquer des différences inter spécifiques, ou liées au contaminant utilisé. De façon générale, les dommages oxydatifs apparaissent lorsque les capacités anti-oxydantes de la cellule sont dépassées et comprennent (Livingston, 2003):

- la peroxydation lipidique (figure 10 ; formation de MDA, produit terminal de la dégradation des lipides, et 4-hydroxyalkenals, ou 4-HNE) eux-mêmes hautement réactifs et les altérations des membranes cellulaires qui en découlent (Ameur *et al.*, 2012)

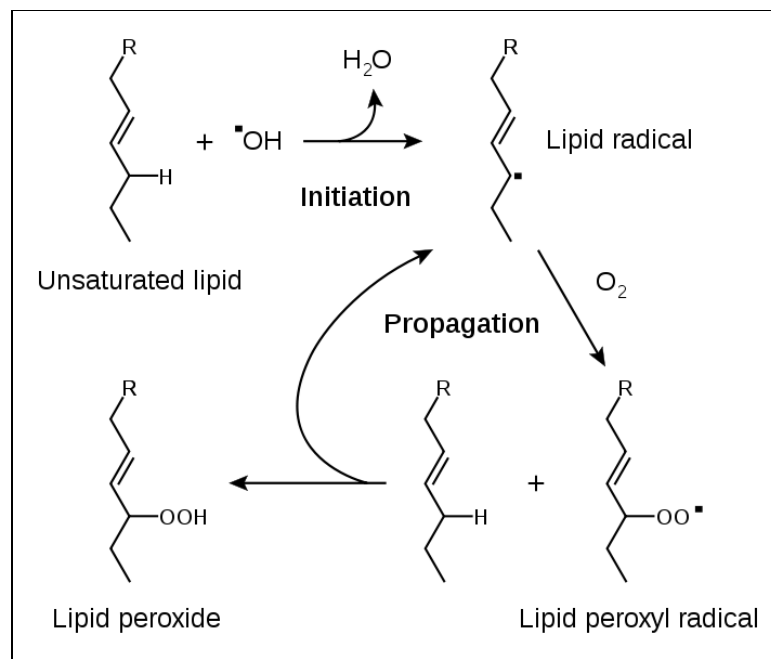


Figure 10 : Mécanismes de la peroxydation lipidique

- l'oxydation des protéines et la formation de groupes carbonyles
- l'oxydation de bases de l'ADN (8-hydroxydeoxyguanosine, 8-oxodGuo ; ou 2,6-diamino-4-OH-5-formamido-pyrimidine, FapyGua ; par exemple).

(1) Genotoxicité

Marabini *et al* (2011) ont observé une augmentation des ROS sur une lignée cellulaire RTG-2 (lignée de fibroblastes gonadiques de truite arc-en-ciel *O. mykiss*) exposée à différents PCBs (PCB 153, 138, 101, 118). Malgré une diminution du GSH et une augmentation de l'activité de la SOD marquant une activation des mécanismes antioxydants, les dommages lipidiques (peroxydation lipidique) ont augmenté ainsi que les dommages à l'ADN marqués par une augmentation des micronoyaux (fragments de chromosomes perdus par le noyau et présents dans le cytoplasme), de l'oxydation des bases de l'ADN (test COMET modifié) et des cassures de l'ADN (test COMET). Par ailleurs, la viabilité des cellules traitées est plus faible que celle des témoins, notamment avec le PCB101. Or, sous l'effet de ce PCB, l'apoptose, mort programmée des cellules, semble significativement induite (taux d'activité des caspases 3/7).

Ainsi, une des principales voies de genotoxicité des contaminants est liée à la formation de ROS et à leurs propriétés électrophiles et radicalaires. Les PCBs, métabolisés par le CYP450, peuvent être à l'origine de métabolites oxydés en semi-quinones qui peuvent altérer l'ADN directement ou par l'intermédiaire des ROS (Schlezingner *et al.*, 2006). Ainsi,

les xénobiotiques, ou leurs métabolites, peuvent également agir directement sur l'ADN, générant des bases oxydées, des adduits à l'ADN (liaison covalente d'une molécule à une base de l'ADN) ou une fragmentation (Amiard et Amiard-Triquet, 2008).

Au niveau de la population, la génotoxicité peut avoir des conséquences particulièrement néfastes lorsque les mutations atteignent les cellules germinales et sont transmises à la descendance. Les effets des polluants peuvent donc parfois se faire ressentir sur plusieurs générations (Amiard et Amiard Triquet, 2008). De même, des mutations intervenant au cours du développement embryonnaire peuvent entraîner la mort du fœtus ou des défauts de développement. On parle alors de tératogenecité.

(2) Apoptose

La génotoxicité et le stress oxydant sont souvent liés à une augmentation de l'apoptose, mort des cellules de façon programmée (Marabini *et al.*, 2011 ; Risso-de Faverney *et al.*, 2001). Elle résulte de mécanismes cellulaires aboutissant à la fragmentation de l'ADN et de la cellule elle-même. De nombreuses protéines comme les caspases interviennent dans ces mécanismes (Takle et Andersen, 2007). La première voie de signalisation est induite par la liaison du TNF (tumor necrosis factor) sur un récepteur membranaire induisant l'activation de la caspase 8. La deuxième voie est activée lorsqu'un stimulus apoptotique entraîne une diminution du potentiel de membrane de la mitochondrie. Un complexe protéique à cytochrome c, l'apoptosome, permet alors l'activation de la caspase 9. Les caspases 8 et 9 permettent l'activation de la caspase 3, caspase effectrice de l'apoptose. Ces voies sont régulées à différents niveaux par de nombreuses protéines et notamment des kinases. Les xénobiotiques peuvent agir directement comme stimuli apoptotiques ou bien par l'intermédiaire des voies de régulation et notamment des kinases. Une cascade d'effets peut également avoir lieu, des facteurs de l'inflammation comme le TNF étant proapoptotique par exemple. De même, le stress oxydant est considéré comme un stimulus de l'apoptose (Krumschnabel et Podrabsky, 2009).

3. Conclusion

En conclusion, les effets des xénobiotiques sont très nombreux et recouvrent un grand nombre de systèmes physiologiques. Ces effets ne sont souvent pas spécifiques d'un polluant ou type de polluant et peuvent aussi être rencontrés en réponse à d'autres types de contraintes (hypoxie, température, ...) ou relever des mécanismes généraux de la réponse au stress. La réponse aux xénobiotiques implique de nombreuses protéines dont l'activité peut être régulée directement par le xénobiotique mais aussi dont l'accumulation peut être modifiée. En

réponse aux xénobiotiques la quantité des protéines peut être modulée par activation de la transcription des gènes (voie de signalisation intracellulaire, facteur de transcription) ou par modulation de leur dégradation (système ubiquitine, protéasome). De nombreuses modifications post-traductionnelles comme les phosphorylations peuvent également moduler leur activité.

Tous les mécanismes et voies de régulations ne sont pas indépendantes et de nombreux effets en cascades ont lieu en réponse aux xénobiotiques. Les mécanismes cellulaires et moléculaires, à court terme, sont précurseurs d'effets observables aux niveaux des organes, de l'individu et pouvant avoir des répercussions écologiques à plus long terme.

Ainsi, la surveillance de la qualité du milieu peut s'appuyer sur la mesure de ces effets biologiques. La connaissance des mécanismes de la réponse aux xénobiotiques permet de mettre en œuvre des mesures précoces de ces réponses à différents niveaux d'organisation, de la transcription des gènes à l'étude environnementale.

III. Utilisation des marqueurs biologiques ou bioindicateurs dans le suivi de la qualité des milieux.

A. Ecoindicateurs et espèces indicatrices et espèces sentinelles

La surveillance de la qualité des écosystèmes s'appuie sur la mesure des effets biologiques à différents niveaux d'intégration. On distingue donc :

-les indicateurs de diversité ou **éco-indicateurs**

- les **bio-senseurs** qui fournissent une réponse très rapide à un stress toxique (ex : truite qui quitte une eau à faible oxygénation) et dont la présence témoigne d'une bonne qualité

- les **bio-traceurs** : organismes sédentaires qui bioaccumulent à long terme des toxiques dans l'environnement et révèlent la présence d'un toxique à long terme même sous le seuil de détection

Biosenseurs, biotraceurs et bioindicateurs ne doivent pas être confondus avec les **espèces sentinelles**, définies comme des organismes chez lesquels la modification de caractéristiques connues peut être mesurée pour attester de l'importance d'une contamination environnementale et de ses implications sur la santé humaine, et constitue un avertissement précoce de ses effets (O'Brien *et al.*, 1993). Elles occupent une place centrale entre les

mesures de paramètres biologiques à des niveaux d'intégration cellulaires et moléculaires et les impacts sur les populations, communautés et écosystèmes (figure 11).

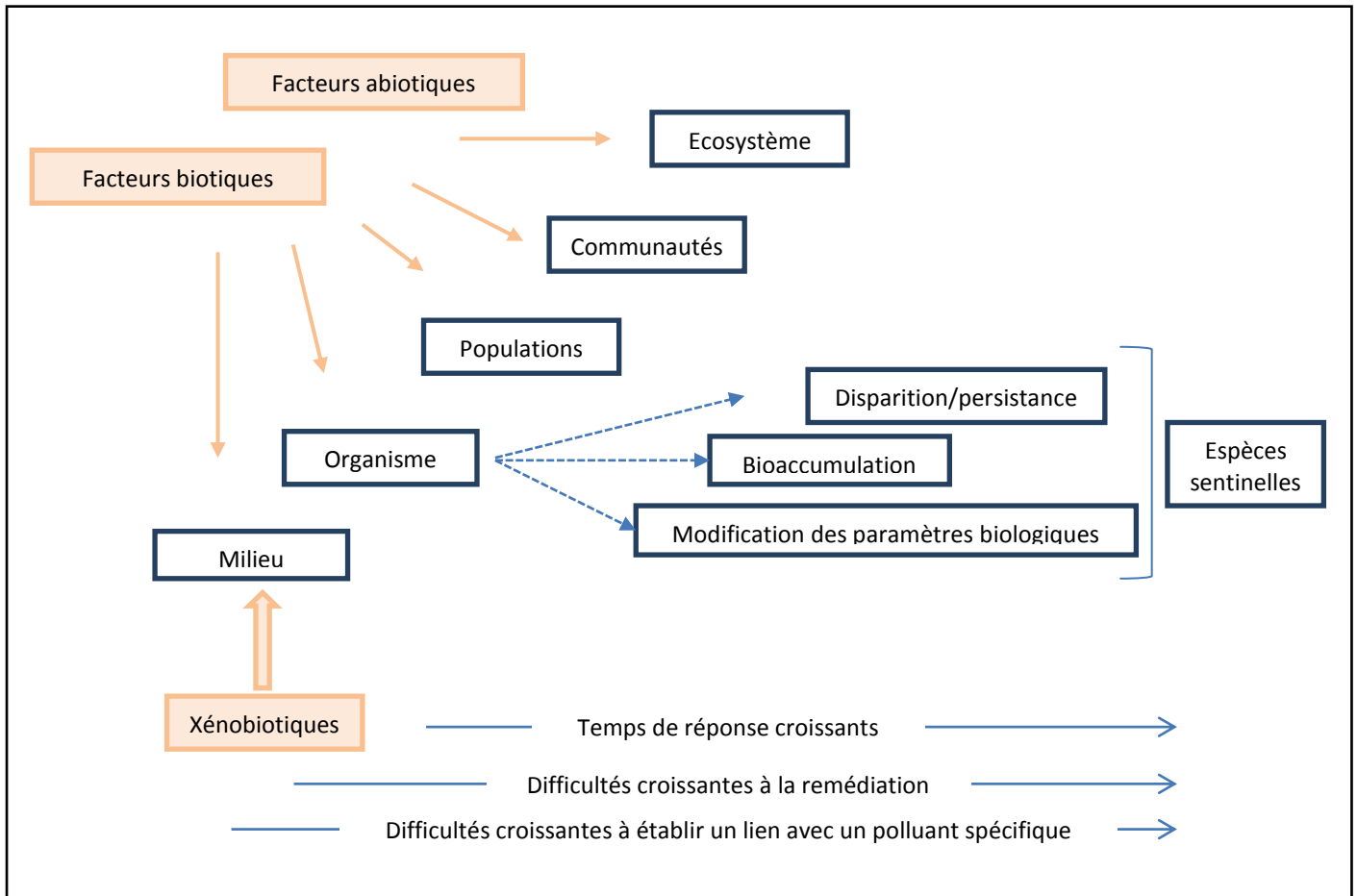


Figure 11 : Place des espèces sentinelles dans la cascade des effets des facteurs biotiques et abiotiques à différents niveaux d'intégration biologiques (d'après Amiard et Amiard-triquet, 2008)

Pour constituer une bonne espèce sentinelle, quelques critères sont à prendre en compte : la taille (suffisamment grande pour collecter une quantité suffisante de tissu), les paramètres doivent être mesurables ou connus dans des conditions non perturbées, la longévité de l'espèce (suffisamment long pour mesurer des effets d'exposition à long terme), un niveau trophique élevé, des migrations limitées afin d'être représentatif de la zone étudiée et l'abondance (O'Brien *et al.* 1993).

1. Les juvéniles de flet européen, *Platichthys flesus*, espèce sentinelle des estuaires

Le flet européen, *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758), est une espèce catadrome (Figures 12 et 13), distribuée depuis la Norvège jusqu'aux côtes du Portugal (Nicolas *et al.*, 2010). Les flets adultes pondent en hiver à l'embouchure des estuaires ou en mer. Les larves sont pélagiques et les juvéniles vivent environ 2 ans en estuaire (Dando, 2011).

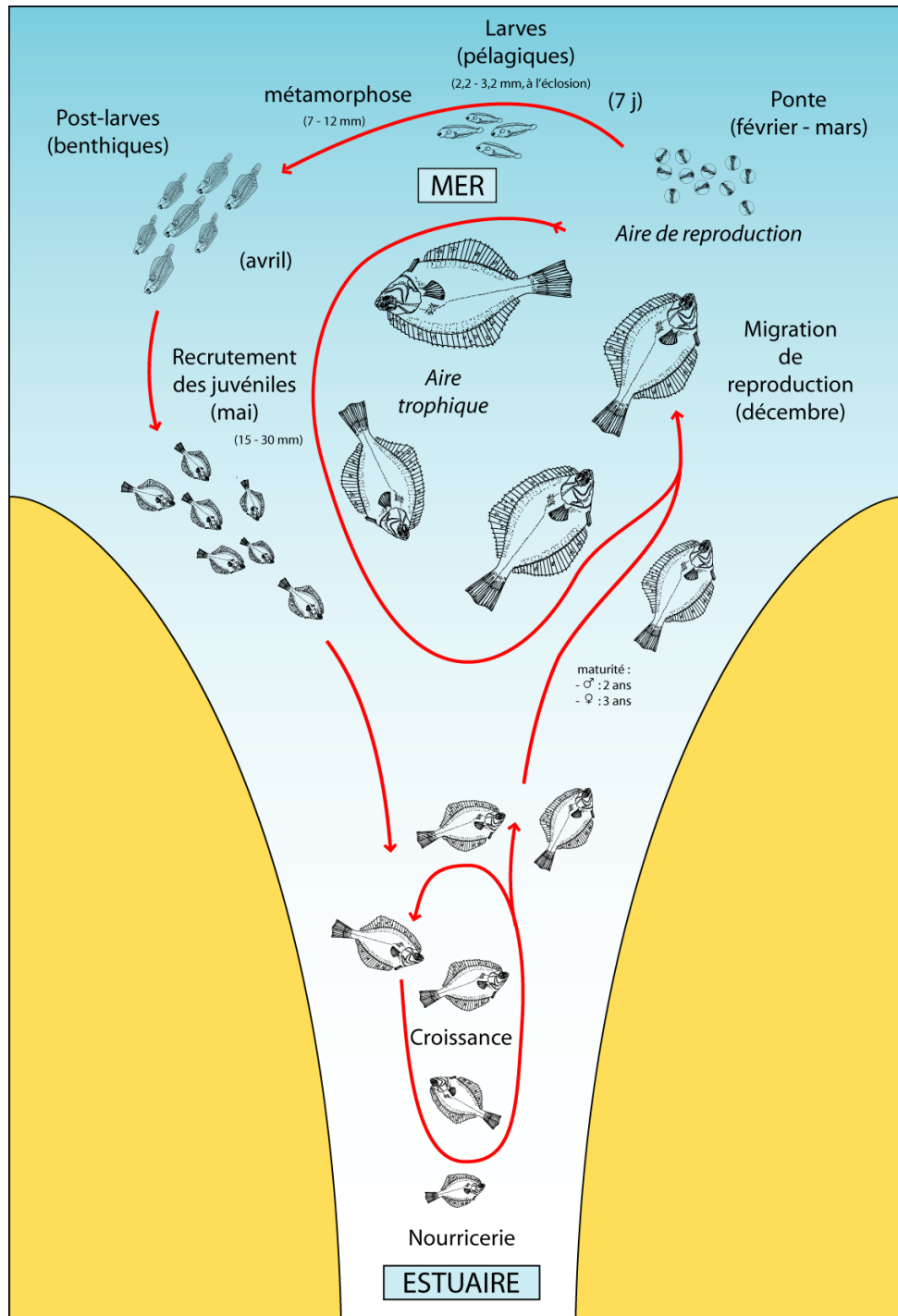


Figure 12 : Cycle de vie du flet européen (*Platichthys flesus*) (Louis Quiniou)

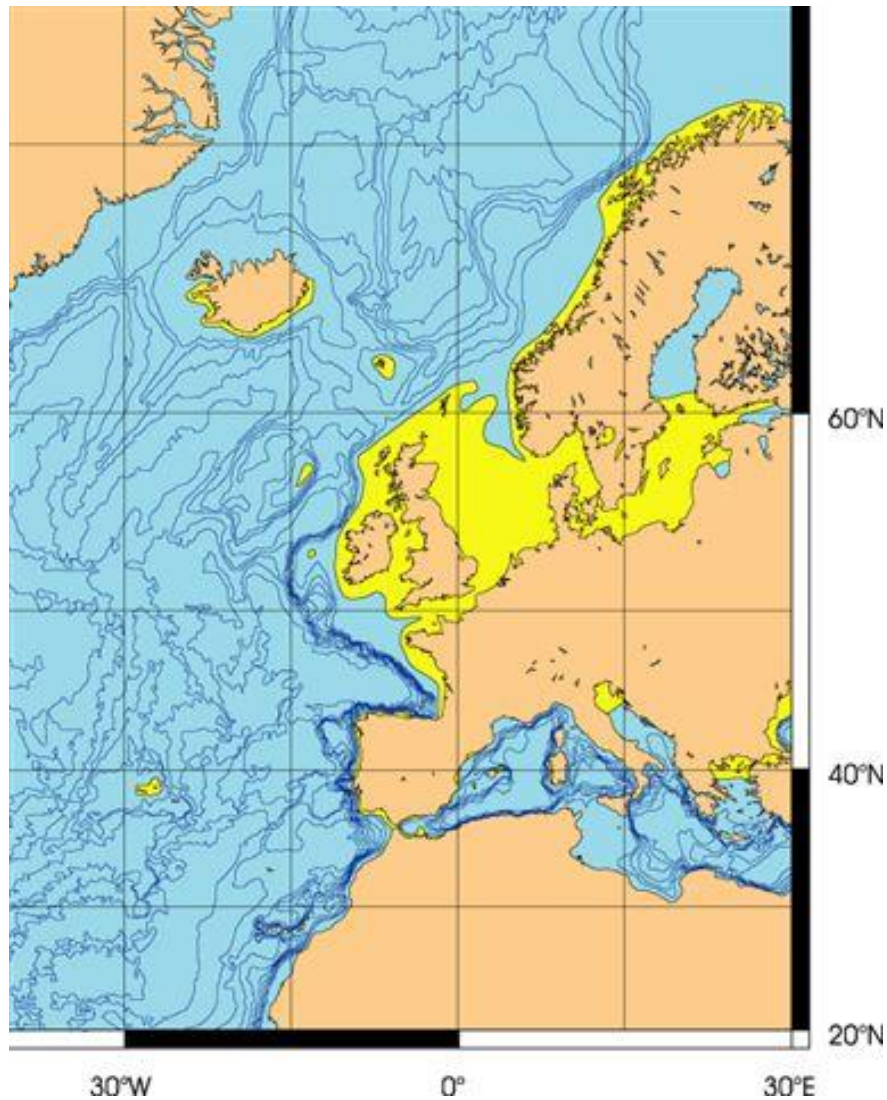


Figure 13 : Carte présentant l'aire répartition (en jaune) du flet européen (*Platichthys flesus*) (Louis Quiniou)

P. flesus démontre une grande capacité d'acclimatation à des environnements changeants caractérisés par une faible salinité, des épisodes hypoxiques et des températures très variables (Larsen *et al.*, 2007; Hemmer-Hansen *et al.*, 2007; Evrard *et al.*, 2010; Marchand *et al.*, 2010). Pendant les premier mois de recrutement, les juvéniles sont regroupés dans des habitats à faible salinité considérés comme nourricerie pour cette espèce. Les poissons plats juvéniles se nourrissent d'organismes benthiques et vivent en association avec les fonds sédimentaires, ou se concentrent la majorité des xénobiotiques apportés par les activités humaines. Ces poissons sont considérés comme particulièrement sensibles à la pollution et aux autres types de dégradation des habitats (Skerritt, 2010). A ce titre, le flet et particulièrement les stades juvéniles sont donc considérés comme une bonne espèce sentinelle afin de suivre la qualité des eaux estuariennes (Amara *et al.*, 2009, Lyons *et al.*, 2010, Leaver *et al.*, 2010).

B. Biomarqueurs

Les paramètres mesurés chez une espèce sentinelle sont les biomarqueurs, définis comme, une variation biochimique, physiologique, comportementale qui peut être mesurée dans un tissu ou un échantillon de fluide corporel, ou au niveau de l'organisme entier, et qui **démontre l'exposition** et/ou les **effets** de cette exposition à un ou plusieurs xénobiotiques (et/ou radiations) (Depledge, 1993).

On distingue les biomarqueurs d'exposition des biomarqueurs d'effets. Les premiers permettent d'attester que l'organisme a été soumis à un xénobiotique et regroupent la détection et la mesure des métabolites du xénobiotique ou le produit d'une interaction de ce xénobiotique avec une molécule cible. Les seconds incluent la mesure au niveau biochimique ou physiologique, ou autre, dans les tissus ou fluides biologiques, d'une altération par rapport aux valeurs normales pouvant refléter une dégradation de l'état de santé ou en être précurseur (Van der Oost *et al.*, 2003; McCarty *et al.*, 1991).

Beaucoup de paramètres peuvent être utilisés pour décrire les effets de l'exposition à des xénobiotiques. Ce sont des marqueurs biologiques traduisant l'impact du xénobiotique sur une fonction physiologique. Ils peuvent constituer de bons candidats en tant que biomarqueurs de défense ou de dommage. Les premiers sont des marqueurs de la mise en place de mécanismes relevant de la toxicocinétique (absorption, distribution, métabolisation, élimination) ou des défenses anti-oxydantes pouvant donc révéler l'exposition de l'individu à un xénobiotique. Les seconds correspondent à tous les paramètres mesurables induits par le polluant et traduisant biochimiquement ou physiologiquement ses effets ou l'altération des fonctions physiologiques. Le tableau 3 recense les paramètres utilisés ou suggérés classiquement comme biomarqueurs.

Table 3 : Principaux paramètres utilisés ou proposés comme biomarqueurs

	Marqueurs moléculaires	Marqueurs cellulaires	Marqueurs au niveau des organes	Marqueurs au niveau de l'organisme	
Distribution	Métallothionéines				Biomarqueurs de défense
Métabolisme phase I	CYP1A, EROD, CYTb5,				
Métabolisme phase II	GSTs, UDPGTs, métabolites fluorescents de la bile				
Elimination, phase III	MXR, P-gp				
Stress oxydant	CAT, SOD, GPx, GR, non enzymatique antioxydant, GSH et GSSG				
	MDA, TBARS				Biomarqueurs de dommages
Réponse corticotrope	Cortisol circulant, 5HIAA/5-HT, DOPAC/DA				
Métabolisme énergétique	Glycémie, lactate, charge en adénylates, LDH	CCO	Rythme cardiaque, consommation en oxygène	Indices de condition, vitesse de croissance	
Genotoxicité	COMET, micronoyaux, adduits de l'ADN			Tumeurs	
Immunotoxicité	Lysosyme, TNF, C3	Phagocytose,			
Perturbateurs endocriniens	VTG			Intersex, imposex	
Neurotoxicité	AChE			comportement	

CYP1A : cytochrome P4501A ; EROD : **Ethoxyresorufin-O-deéthylase** ; CYTb5: cytochrome b5; GST:gluthation S transferase; UDPGT: Uridine Diphosphate Glucuronyltransferase ; MXR : multixenobiotic resistance ; P-gp : P-glycoprotéines ; CAT : catalase ; SOD : superoxyde dismutase ; GPx, gluthation peroxydase ; GR : gluthation reductase ; GSH/GSSG : gluthation réduit/oxydé ; MDA : malondialehyde ; TBARS : thiobarbituric acid reactive substances ; 5HIAA /-HT : Acide 5-hydroxyindolacétique/serotonine ; DOPAC/DA : **3,4-Dihydroxyphenylacetic acid**/ dopamine ; LDH : lactate deshydrogenase ; TNF : tumor necrosis factor ; C3 : complexe 3 du système du complément ; VTG : vitellogenine ; AChE : acetylcholine esterase ; CCO : cytochrome C oxydase

Cependant, si la démonstration de l'induction de ces paramètres par les polluants a souvent été faite en conditions contrôlées (voir paragraphe effets sur les organismes), il est difficile à l'inverse de caractériser la pollution de l'environnement par leur mesure. En effet, de nombreuses perturbations de l'environnement (facteurs confondants) sont susceptibles d'entraîner une modification de ces paramètres et tous ne permettent donc pas d'attester de l'exposition à un polluant.

Van der Oost *et al.* (2003) ont proposé 6 critères d'évaluation des forces et faiblesses des biomarqueurs candidats:

- la méthode de quantification du biomarqueur doit être fiable, relativement bon marché, et facile à mettre en œuvre

- la réponse du biomarqueur doit être sensible à l'exposition et/ou à l'effet d'un polluant afin d'être un paramètre précoce de détection

- les valeurs du biomarqueur en conditions normales doivent être connues afin de distinguer la variabilité naturelle (bruit de fond) de la réponse induite par le contaminant (signal)

- les impacts des facteurs confondants sur le biomarqueur doivent être établis

- les mécanismes sous-jacents de la relation entre l'exposition au polluant et la réponse du biomarqueur (dose et temps de réponse) doivent être établis

- la signification toxicologique du biomarqueur, c'est-à-dire les relations entre sa réponse et les impacts à long terme sur l'organisme doivent être établies.

Par ailleurs, il est préférable que la mesure de ces biomarqueurs soit non invasive.

Selon ces critères, il établit une évaluation de différents biomarqueurs et montre ainsi que les 2 plus performants, avec une note de 5/6, sont la mesure de l'activité EROD et celle des métabolites dans la bile.

L'activité EROD (ethoxyresorufine-O-deethylase) est catalysée par le cytochrome P4501A et sa mesure est couramment utilisée comme biomarqueur d'exposition aux polluants (Burgeot et Menard, 2004). Ce test de l'activité EROD est le premier biomarqueur à avoir fait l'objet d'une normalisation (norme XP Iso/TS 23893-2 décembre 2007).

Par ailleurs, d'autres biomarqueurs, non pris en considération dans la revue de Van der Oost *et al.* (2003) sont utilisés en suivi environnemental.

La mesure de l'imposex est utilisée comme biomarqueur de la pollution au TBT sur les côtes européennes. En effet, suite à l'interdiction de l'utilisation de ce composé, le suivi de la contamination des eaux côtières au TBT a été mis en place. Il consiste en la mesure du développement des organes génitaux masculins chez les femelles de *Nucella lapilus* et notamment du stade de développement du canal défèrent par le VDSI (vas deferens sequence index) (Gibbs *et al.*, 1987).

D'autre part, l'observation par une équipe de l'INERIS de cas d'intersex chez des goujons de la rivière Dore (France-63) a révélé la présence de perturbateurs endocriniens dans les eaux. En effet, 60% des goujons présentaient de l'intersex en aval d'une usine pharmaceutique contre 5% en amont. La découverte de ce phénomène a conduit les autorités locales et la direction de l'usine à revoir le traitement des rejets des effluents de cette dernière (Sanchez *et al.*, 2011).

Ces biomarqueurs macroscopiques présentent l'avantage d'être faciles à mettre en œuvre dans le cadre du suivi d'un écosystème. Cependant, cette réponse est déjà tardive comparativement aux biomarqueurs moléculaires, de réponse beaucoup plus précoce. Afin de pallier aux biais de chaque biomarqueur potentiel, de plus en plus d'études tendent à considérer un ensemble de biomarqueurs voire à constituer des indices de qualité à partir de ces marqueurs (« bioeffect assessment index » Broeg *et al.*, 2005, « integrated biomarker index » Broeg et Lehtonen, 2006, « biomarker response index » Hagger *et al.*, 2008). Des méthodes d'analyse statistiques telles que les analyses en composantes principales (Evrard *et al.*, 2010a et b) ou les analyses de correspondance (Fonseca *et al.*, 2011) permettent de mettre en évidence les corrélations entre les réponses mesurées pour chaque biomarqueur étudié, les sites d'études et leur profil de contamination.

C. Approches globales et sans *a priori*

Les approches globales et sans *a priori* sont aujourd'hui de plus en plus utilisés pour étudier la réponse des organismes à une contamination chimique. Ces approches présentent différents avantages :

- Elles permettent de détecter plusieurs biomarqueurs connus en une seule analyse tout en ayant une vue d'ensemble des fonctions physiologiques impactées.
- Elles offrent également la possibilité d'approfondir les connaissances fondamentales sur les mécanismes de la réponse aux xénobiotiques et d'identifier de nouveaux biomarqueurs.

Ce sont des méthodes comparatives basées sur l'étude de l'ensemble des gènes transcrits en ARN messagers (transcriptomique), des protéines (protéomique), des métabolites (métabolomique), et la détection des molécules différentiellement exprimées en réponse à une perturbation environnementale. Si les études transcriptomiques sont largement répandues depuis le début des années 90, les études protéomiques se développent depuis une dizaine d'année et les études métabolomiques commencent à prendre de plus en plus d'importance. Les protéines, qui constituent une grande partie des biomarqueurs utilisés actuellement, peuvent refléter la réaction des cellules, pouvant être spécifique d'un polluant et donc apporter des connaissances directes sur les mécanismes d'action (Sarkar *et al.*, 2006). Les approches transcriptomiques (microarrays) ont été précurseurs dans ce sens mais de nombreuses études protéomiques ont maintenant montré leur faisabilité (Lemos *et al.*, 2010).

a) Approches protéomiques

L'étude du protéome est complémentaire de celle du transcriptome puisque le profil protéique est influencé par le turnover des protéines (ie. synthèse et dégradation), les modifications post-traductionnelles et leur compartimentation cellulaire. En ce sens, les protéines sont plus représentatives des effets au niveau physiologique et plus proches de la réponse phénotypique. Leur étude occupe donc une place pivot dans l'étude globale et systémique des mécanismes de réponse des organismes à la contamination chimique. Par ailleurs, la réponse au niveau protéique intervient à plus court terme et à plus faibles doses que la réponse phénotypique. Les études protéomiques présentent donc un grand potentiel dans l'identification de nouveaux biomarqueurs et ont été mises en œuvres dans de nombreuses études chez les organismes marins vertébrés et invertébrés (Lemos *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2011; Karim *et al.*, 2011; Tomanek, 2011). Les études protéomiques

permettent d'apporter de nouvelles informations sur la nature de la réponse à une contamination chimique et les mécanismes d'action des xénobiotiques ou autres contraintes environnementales (Veldhoen *et al.*, 2012).

Ces études peuvent être séparées en 3 catégories : études précurseurs utilisant uniquement la signature d'expression protéique (PES, « Protein expression signature ») obtenue par 2DE (2 dimensional electrophoresis ; Shepard *et al.*, 2000) ou SELDI-MS (Nilsen *et al.*, 2011) en réponse à un polluant. Le second groupe comprend l'identification des protéines après établissement de leur PES pour un tissu spécifique, une cellule ou à des niveaux subcellulaires impliqués dans la détoxification des xénobiotiques. Le troisième groupe s'intéresse aux modifications post-traductionnelles (PTM, « post translational modification ») comme un signal de toxicité (Sheehan, 2006 ; Mann et Jensen, 2003).

Il existe de nombreuses méthodes permettant d'appréhender le protéome d'un organisme, d'un tissu ou d'une fraction subcellulaire (Compos *et al.*, 2012 ; Dowling et Sheehan, 2006 ; Martyniuk *et al.*, 2011 ; Rabilloud *et al.*, 2010 ; Monteoliva et Albar, 2004). Toutes reposent sur des principes communs : la première étape concerne l'extraction des protéines. Ces protéines sont digérées en fragments peptidiques (souvent par la trypsine) avant (« shotgun proteomic », « top down approach ») ou après séparation (« bottom up approach »). On distingue la protéomique sur gel (« gel based proteomic »), utilisant des techniques d'électrophorèse en deux dimensions pour la séparation des protéines, des techniques sans gel (« gel free proteomic ») pour lesquelles la séparation se fait par chromatographie. Dans certains cas, les protéines peuvent être marquées avant (par fluorescence ou marquage isotopique) ou après (fluorescence, bleu de coomassie, nitrate d'argent après électrophorèse en 2 dimensions) séparation. Ce marquage permet de repérer les protéines ou peptides différenciellement présents dans une condition par rapport à une autre, et de les identifier.

L'identification des protéines se fait aujourd'hui principalement par spectrométrie de masse (Cravatt *et al.*, 2007). Différentes techniques existent. Elles reposent toutes sur un principe commun :

- les peptides sont fragmentés en ions volatiles de différentes masses (à partir d'une solution par excitation électrique en electrospray ESI-electrospray ionisation, ou à partir d'une surface solide par excitation LASER en MALDI-Matrix Assisted Laser Desorption Ionization).

- Les ions sont séparés en fonction de leur masse et leur charge (rapport m/z) dans l'analyseur (par sélection des masse dans un champ magnétique créé entre 4 électrodes en

quadrupole ; ou par analyseur en temps de vol, TOF, Time of flight ; en utilisant leur mouvement rectiligne)

-l'abondance relative des ions en fonction de leur m/z est ensuite détectée. Les ions créent un courant permettant de générer le spectre de masse.

Par l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (Tandem mass spectrometry MS-MS), les ions détectés (ions précurseurs) sont isolés puis fragmentés. Le MALDI TOF-TOF permet cette fragmentation. Il est alors possible de déterminer la séquence en acides aminés et de séquencer *de novo* les peptides puis d'identifier la protéine par recherche d'homologie (BLAST-Basic local alignment search tool) sur des bases de données protéiques ou d'ESTs.

L'électrophorèse en 2 dimensions est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle en écotoxicoprotéomique (Slattery et al., 2012). De nombreuses études précurseurs ont appliqué la 2-DE pour générer une PES unique en réponse à l'exposition à un polluant. La moule (genre *Mytilus*), espèce sentinelle des zones côtières, a ainsi été utilisée pour identifier des PES suite à l'exposition au cuivre ou aux PCBs (Olsson *et al.*, 2004, Shepard et Bredley, 2000, Shepard *et al.*, 2000). L'huitre américaine *Crassostrea virginica* a été utilisée pour détecter des changements en réponse à une exposition au zinc (Meiller et Bradley, 2002). Lorsque la méthode est utilisée pour comparer des embryons de poisson zèbre (*Danio rerio*) exposés au 17 β -oestradiol et au 4-nonylphenol, mimétique des œstrogènes, il est possible de montrer des différences dans leur PES ce qui suggère que les mécanismes d'actions de ces polluants sont plus différents l'un de l'autre que ce qui était admis auparavant (Shrader *et al.*, 2003).

Cette approche conceptuelle des signatures a trouvé une nouvelle application à travers la « surface-enhanced laser desorption/ionisation (SELDI) MS (Tang *et al.* 2004). La SELDI-MS sépare tout d'abord les protéines par chromatographie utilisant une puce protéique, qui est ensuite analysée par spectrométrie en temps de vol (MALDI-TOF). Des différences d'empreinte de masses peuvent représenter une signature unique qui peut discriminer différentes maladies ou états d'un organisme et être utilisée comme biomarqueurs. Par exemple, son utilisation dans l'analyse de la glande digestive de la moule bleue (*Mytilus sp.*) en conditions environnementales entre un site contrôle des sites contaminés aux HAPs ou en métaux lourds (Knigge *et al.*, 2004) comme en conditions expérimentales chez des moules exposées au pétrole, ou au pétrole supplémenté en alkylphenols (Bjornstad *et al.*, 2006), les profils obtenus ont permis de re-classifier correctement les échantillons provenant des différents traitements avec un succès de 90%.

Nilsen *et al.* (2011) ont établi une PES constituée de 13 pics suite à l'exposition de morues males *Gadus morhua* au 17β -œstradiol. Par la suite, une PCA a permis de différencier chez des juvéniles de morue les individus exposés au 4-nonylphenol (oestrogéno-mimétique) de ceux non-exposés sur la base de la PES répondant au 17β -œstradiol. Ces résultats indiquent que cette PES pourrait être utilisée comme marqueur d'exposition aux œstrogènes chez les adultes comme chez les juvéniles. Parmi les 13 pics constituant la PES, 2 ont été identifiés comme étant la VTG et une ZRP (zona radiata protein).

Les récentes avancées en spectrométrie de masse et l'expansion des bases de données protéiques permettent l'identification des protéines après détermination de la PES. C'est ce champ de la protéomique qui constitue actuellement le corps des approches conduites.

De nombreuses études ont en effet tiré parti de ces progrès afin d'investiguer les mécanismes de réponse des organismes aux contraintes environnementales (Slattery *et al.*, 2012) et notamment aux polluants, tant en conditions expérimentales qu'environnementales.

Les approches protéomiques et notamment en électrophorèse 2D ont permis de mettre en évidence l'implication de grandes voies métaboliques comme le métabolisme énergétique, les défenses anti-oxydantes, le métabolisme des acides aminés, et de mieux en comprendre les mécanismes (Tomanek, 2011 ; Slattery *et al.*, 2012 ; Veldhoen *et al.*, 2012 ; Forné *et al.*, 2010 ; Lemos *et al.*, 2010).

Même si quelques études déterminent des comparaisons de profils protéiques d'organismes marins évoluant dans différents sites présentant des profils de contaminations différents (Company *et al.*, 2011 ; Ripley *et al.*, 2008 ; Romero-Ruiz *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2008), elles restent relativement peu nombreuses et la majorité des études se sont concentrées sur l'exposition expérimentales et en conditions contrôlées à différentes classes de polluants et notamment les métaux, dans quelques cas les HAPs, PCBs, pesticides ou perturbateurs endocriniens.

Peu d'études ont été mises en œuvre avec des cocktails combinant plusieurs polluants. Pourtant, les polluants peuvent avoir des effets synergiques. La présence de contaminants différents peut se traduire par une exacerbation comme par une minoration des effets (Celander, 2011). Costa *et al.* (2010) ont ainsi montré chez la sole *Solea senegalensis* par électrophorèse en 2 dimensions que la réponse protéique et les dommages cellulaires par apoptose dans le foie diffèrent, après contamination, par le BaP seul, le Cd seul ou la combinaison des 2 contaminants. Cd et BaP induisent par exemple des enzymes antioxydantes (peroxyredoxine ou GPx respectivement) alors que la co-exposition aux deux contaminants altère cette induction.

b) Biologie des systèmes

La biologie systémique, dont le but est d'appliquer différentes approches afin d'étudier un système et de modéliser et découvrir des propriétés émergentes de ce système, ont été proposées comme un moyen prometteur pour attester les effets des polluants au niveau cellulaire. Elles s'appuient notamment sur les approches -omics au centre desquelles la protéomique joue un rôle pivot, et permettent une évaluation du risque plus intégrative des effets que les approches ciblées (Lemos *et al.*, 2010 ; Lopez-Barea et Gomez-Ariza, 2006 ; Waters et Fostel 2004, Garcia-Reyero et Perkino, 2011).

Ankley *et al.* (2009) ont ainsi mis en œuvre une approche combinant à la fois transcriptomique, protéomique, métabolomique et bioinformatique chez le vairon à tête de boule *Pimephales promelas* et le poisson zèbre *Danio rerio* soumis à 12 perturbateurs endocriniens différents afin de retracer les voix métaboliques impliquées à différents niveaux d'organisation.

A l'heure actuelle, les projets combinant les approches à différents niveaux d'intégration et notamment la transcriptomique et la protéomique dans un contexte écotoxicologique se développent, notamment en raison du séquençage de nouvelles espèces. Ainsi, le séquençage du génome de la morue *Gadus morhua* (Johansen *et al.*, 2009 ; www.codgenome.no et The Atlantic Cod Genomics and Broodstock Development Project (CGP): <http://www.codgene.ca>) puis de son transcriptome (Johansen *et al.*, 2010) ont ouvert la voie à la construction de puces à ADN et à la multiplication des études transcriptomiques sur cette espèce (Lie *et al.*, 2009 ; Edvardsen *et al.*, 2011 ; Drivenes *et al.*, 2012 ; Booman *et al.*, 2011). Par ailleurs, des études protéomiques de la réponses de la morue à la contamination chimique (Berg *et al.*, 2011 ; Bohne-Kjersem *et al.*, 2009 ; Karlsen *et al.*, 2011) ont été conduites, montrant ainsi que tous les outils sont réunis pour une étude systémique.

D'autres équipes ont montré la complémentarité des approches protéomiques et transcriptomiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Dondero *et al.*, 2010), le vairon à tête de boule *P. promelas* soumis au tétrabromobisphénol A ou éthinyloestradiol (De Wit *et al.*, 2008 ; De Wit *et al.*, 2010).

De même, des études ont montré la complémentarité d'approches transcriptomique et métabolomique dans la réponse de l'épinoche *Gasterosteus aculeatus* à la contamination aux HAP (Williams *et al.*, 2009), à l'éthinyloestradiol (Katsiadaki *et al.*, 2010), ou encore au Cuivre (Santos *et al.*, 2010).

IV. Objectifs de la thèse

Chez le flet européen *Platichthys flesus*, de nombreuses études transcriptomiques de la réponse à une contamination chimique ont été réalisées par qPCR (Evrard *et al.*, 2010 ; 2012 ; Calves *et al.*, 2011), SSH (Marchand *et al.*, 2006 ; Evrard *et al.*, 2010). Des approches par puce à ADN (Williams *et al.*, 2003, 2007, 2008 ; Falciani *et al.*, 2008) ont également permis avec succès d'étudier la réponse de cette espèce non modèle à diverses contaminations aussi bien en conditions expérimentales qu'environnementales.

Par ailleurs, un exercice d'inter-comparaison entre 7 laboratoires a permis de valider des résultats comparables dans l'analyse de métabolites par RMN du proton dans des foies de flet. Les mêmes résultats ont été obtenus par les 7 équipes sur le même jeu de poissons provenant de sites considérés comme sains en comparaisons de sites contaminés (Viant *et al.*, 2009). Cette première étude a donc permis de valider l'utilisation de la métabolomique par RMN du proton pour des études environnementales.

Williams *et al.* (2011) ont combiné ces approches transcriptomique, génétique (microsatellites), métabolomique, biomarqueurs (concentrations en VTG et MT ; activités glutathion réductase, GST et EROD), et modélisation informatique chez des poissons provenant de 7 estuaires différents des côtes de Grande-Bretagne et présentant des profils de contamination différents. Ils ont ainsi montré que les profils observés, comprenant ces différents niveaux d'intégration, peuvent être corrélés au profil de contamination des estuaires.

A l'heure actuelle, aucune étude protéomique n'a été publiée chez cette espèce.

Le but de cette étude est d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de réponse à une contamination chimique (environnementale ou expérimentale) chez le flet européen *Platichthys flesus* par une approche protéomique en électrophorèse à deux dimensions afin, éventuellement, d'identifier de nouveaux biomarqueurs.

Plusieurs points nécessitent une attention particulière :

- utilisation de cocktail de polluant à des doses environnementales**
- couplage d'approche expérimentale et environnementale**
- couplage avec études à des niveaux d'intégration complémentaires (expression de gènes par qPCR, activités enzymatiques, indices de condition, système immunitaire) dans le cadre d'un vaste projet Européen Interreg Transmanche DIESE.**

Chapitre 2 :

Cartographie du protéome de 4 organes chez le Flet
Européen *Platichthys flesus* par électrophorèse en 2
dimensions

Les résultats présentés et discutés dans ce chapitre sont détaillés dans l'article « Towards a proteome map of 4 tissues in the European flounder *Platichthys flesus* » figurant à la suite de cette synthèse.

Introduction

- Les juvéniles de Flet Européen *Platichthys flesus* sont considérés comme une espèce sentinelle pour le suivi de la qualité de l'eau des estuaires
- Les estuaires sont des milieux variables où les organismes sont soumis à des stress osmotiques, hypoxiques, thermiques et chimiques, naturels et dus aux activités humaines
- Les biomarqueurs moléculaires sont une bonne méthode pour étudier le fonctionnement des organismes en réponse aux contraintes environnementales comme pour suivre la qualité de l'environnement
- Les méthodes globales, ou -omics, permettent de détecter des dérégulations de plusieurs biomarqueurs simultanément mais aussi d'identifier de nouveaux biomarqueurs
- Chez le flet, des approches de transcriptomiques par puce à ADN ou SSH ont été utilisées afin d'étudier la réponse du flet européen à une contamination chimique tant en conditions expérimentales qu'environnementales
- Aucune étude protéomique n'a été publiée à ce jour chez le flet. Cette étude a été conçue comme une mise au point de l'électrophorèse en 2 dimensions chez *P. flesus*.

L'objectif de cette étude est de réaliser la cartographie du protéome par électrophorèse en 2 dimensions de 4 organes du flet afin de valider le protocole d'électrophorèse en 2 dimensions et d'identification des protéines mais aussi de caractériser les fonctions de ces 4 organes à travers leurs protéines majoritaires afin d'évaluer leur potentiel dans l'étude des réponses du flet européen aux contraintes environnementales.

Plan expérimental

- Modèles : flets juvéniles issus d'un élevage
- Echantillonnage
 - Prélèvement du foie, du rein antérieur, du tube digestif, du muscle squelettique et congélation immédiate dans l'azote liquide.
- Analyse protéomique par électrophorèse en 2 dimensions.

De nombreux paramètres sont importants dans la mise au point de l'électrophorèse en 2 dimensions à chaque étape du processus :

- Lors de l'extraction, le protocole doit permettre d'extraire le maximum de protéines, quelle que soit leur solubilité, tout en évitant de les modifier ou dénaturer ainsi que d'introduire des molécules perturbant la migration notamment en première dimension. L'emploi de détergent doit donc être limité par exemple. La composition du tampon détermine également le choix de la méthode de dosage qui devra être compatible. Une étape de précipitation est nécessaire afin de purifier les protéines. Les sels, qui perturbent la première dimension, doivent notamment être retirés.
 - ➔ Le tampon choisi est le tris-HCl pH=6.8. Il a été préféré à d'autres tampon classiquement utilisé en 2D comme les tampons à base d'urée car ces derniers ne sont pas compatibles avec la majorité des méthodes de dosage (une étape de précipitation est nécessaire avant dosage)
 - ➔ Les échantillons de cette étude ont été broyés à l'ultraturax mais le laboratoire ayant acquis un broyeur à bille sous azote liquide (Precellys couplé à un Cryolys, Bertin technology) par la suite, les échantillons des études présentées aux chapitres 3 et 4 ont été broyés à l'aide de ce dernier. En effet, le broyeur à bille sous azote assure que l'échantillon ne décongèle pas pendant le broyage. Il permet également de broyer plusieurs échantillons simultanément selon un protocole standardisé et de limiter la variabilité entre échantillons.
 - ➔ Les dosages de protéines totales ont été effectués grâce à la méthode de Lowry (kit RC-DC, Biorad).
 - ➔ Les échantillons ont ensuite été précipités au TCA/acétone.
 - ➔ Les échantillons ont été resolubilisés dans un tampon contenant du destreak (Destreak rehydrations solution, GE Healthcare). Ce produit est un détergent qui rompt les ponts disulfure des protéines et permet une meilleure résolution dans la partie basique des gels 2D que les tampons traditionnels comme le DTT.
- Au cours de l'IEF (iso-electro-focalisation), les protéines sont séparées dans un gradient de pH sur une bandelette (strip) à faible concentration en acrylamide en fonction de leur point isoélectrique, pH auquel les protéines ne portent plus de

charge et donc ne migrent plus dans le champ électrique. La gamme de pH de l'IEF doit être choisie en fonction des objectifs de l'étude. L'IEF est considérée comme l'étape la plus cruciale pour la réussite de l'électrophorèse 2D et notamment d'une bonne résolution des gels. Le protocole de voltage appliqué ainsi que le voltage/heure total sont importants.

- ➔ Les IEF ont été conduites sur strips pH 3-10 linéaires (GE Healthcare). Cette gamme de pH est la plus large et permet donc une vue globale de l'ensemble du protéome.
 - ➔ Le protocole appliqué est celui conseillé par le constructeur (Amersham biosciences)
- Au cours de la deuxième dimension, les protéines sont séparées par SDS-page en fonction de leur masse moléculaire (MW) dans un réseau d'acrylamide. Les plus grosses protéines migrent moins vite que les petites. La concentration en acrylamide est déterminante pour la séparation des protéines
 - ➔ Les gels utilisés ont été coulés en gradient 10-15% en acrylamide ce qui permet une bonne séparation des grosses protéines comme des petites. Ils mesurent 15x16 cm, ce qui permet une bonne séparation mais plusieurs protéines peuvent malgré tout co-migrer et être localisées sur le même spot. La migration a lieu en système vertical dans du tampon Tris-glycine-SDS (0,1%).
 - La coloration des gels est classiquement choisie en fonction de sa sensibilité, de sa linéarité pour la quantification, de sa compatibilité avec la spectrométrie de masse, de son coût et de la disponibilité des appareils de détection (scanner détectant la fluorimétrie, par exemple)
 - ➔ La méthode choisie est la coloration au bleu de Coomassie. Elle présente une bonne compatibilité avec la spectrométrie de masse, est la moins coûteuse des méthodes et ne nécessite aucun appareil de détection spécifique. Les images ont été scannées grâce à un appareil scanneur optique en mode transparence.
 - L'analyse des images et le traitement statistique sont cruciaux pour la sélection des spots dérégulés en protéomique comparative. Les logiciels d'analyse d'image

permettent de quantifier l'intensité des spots et donc de donner une idée de la quantité de protéine.

- ➔ En première intention, dans cette étude les spots les plus intenses ont été sélectionnés visuellement afin d'être identifiés. Le logiciel Prodigy Samespot (Non Linear dynamics) a ensuite été acquis par le laboratoire et utilisé pour aligner les gels et déterminer quels spots étaient similaires. L'ensemble des études présentées dans cette thèse ont d'abord été analysés grâce à ce logiciel. Par la suite, le laboratoire a acquis le logiciel Progenesis Samespot (Non Linear Dynamics). Il permet un meilleur alignement des gels et une analyse statistique plus approfondie. Les résultats présentés aux chapitres 2 et 3 ont été retraités grâce à ce logiciel. Cependant, l'article présenté au chapitre 4 ayant déjà été publié, les données n'ont pas pu être retraitées.
- Les spots sélectionnés sont excisés. Les protéines sont digérées par la trypsine en milieu basique (Bicarbonate d'Ammonium, BICAM) à l'intérieur même du morceau de gels excisés (in-gel digestion). Les peptides sont ensuite extraits du morceau de gels par des bains successifs basique (BICAM) et acide (acide formique). L'utilisation en alternance d'acétonitrile avec les solutions aqueuses (enzyme, BICAM, acide formique) permet alternativement de déshydrater (acétonitrile) le gel et ainsi récupérer les peptides ou de le réhydrater et d'y faire pénétrer les solutions aqueuses (enzyme pour la digestion, solubilisation des peptides à pH acide ou basique). Les solutions de peptides sont évaporées au speed vac.
- L'identification des protéines est le facteur limitant pour des espèces non-modèles pour lesquelles le génome n'est pas entièrement connu ni annoté. Le principe a déjà été présenté en introduction.
 - ➔ La méthode choisie est la spectrométrie de masse MALDI TOF-TOF. Elle a été conduite sur la plateforme de spectrométrie de masse de l'Université de Bretagne Occidentale. Cette méthode nécessite que les peptides soient solubilisés dans une solution acide d'acide hydroxycinnamique (HCCA) avant leur dépôt sur une cible d'acier poli.

- Les spectres de masse obtenus ont été comparés à des banques de données grâce au logiciel Peaks, permettant la comparaison des spectres obtenus à des bases de données de séquences EST. Le génome de *P. flesus* n'étant pas disponible, nous avons dû également dans certains cas procéder à un séquençage *de novo*. Plusieurs bases de données ont été utilisées : une base non redondante de NCBI (NR) et des bases construites contenant les EST de vertébrés, de poissons ou de *Platichthys*. Il est nécessaire de renouveler ces bases de données régulièrement, et sur la durée de la thèse, nous avons pu constater que l'implémentation des bases de données permet progressivement d'améliorer les ratios d'identification. Les résultats présentés dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse sont le résultat d'une interrogation des bases de données ayant eu lieu en août/septembre 2012. Les résultats du chapitre 4 sont antérieurs d'un an.
- Le matériel utilisé permet de conduire 12 analyses simultanément, tant au niveau de la première dimension, du coulage des gels, que de la deuxième dimension. Le système permet de couler simultanément 12 gels, permettant ainsi une bonne reproductibilité.

Synthèse des résultats

- Les profils protéiques en électrophorèse à 2 dimensions montrent que le profil protéique du muscle squelettique se différencie de ceux du foie, du rein et du tube digestif par la présence d'un petit nombre de protéines très abondantes au contraire des autres organes qui sont constituées d'un grand nombre de protéines peu abondantes
- Sur 170 spots excisés, 74 ont été identifiés soit des taux d'identification de 36, 68, 21, 46% dans le muscle, le tube digestif, le rein et le foie respectivement.
 - Ces taux d'identification correspondent à ceux rencontrés dans la littérature pour des espèces non modèles, c'est-à-dire pour lesquelles le génome n'est pas entièrement connu et annoté.
 - Les limites à de meilleurs taux d'identifications sont 1) la disponibilité en séquences EST dans les bases de données pour les identifications *de novo* 2) la qualité des spectres de masses, notamment pour les protéines les moins abondantes.

- Il existe une redondance dans les identifications, c'est-à-dire que des protéines ont été identifiées plusieurs fois à partir de spots différents et donc avec des pI et/ou des MW différents
 - ➔ Ces profils pourraient traduire la présence d'isoformes différentes d'une protéine ou de modifications post-traductionnelles (par exemple phosphorylation), ces différences pouvant impacter la fonctionnalité de la protéine.
 - ➔ Cette redondance peut apparaître pour une protéine sur un même organe ou sur des organes différents, marquant alors des différences fonctionnelles entre organes.
- Les protéines identifiées ont été regroupées en fonction de leur fonction principale. La majorité des protéines identifiées interviennent dans le métabolisme énergétique, le transport et le métabolisme des lipides, la synthèse ou le métabolisme des protéines ou sont des protéines de stress ou impliquées dans les voies de signalisation, ou encore des protéines de structure. Il apparaît une différence dans la fonctionnalité des organes : plus de 60% de l'intensité des spots identifiés correspondent à des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique dans le muscle contre de 15 à 23% dans les 3 autres organes.
 - ➔ le métabolisme du muscle est orienté vers le métabolisme énergétique
 - ➔ toutes les protéines impliquées dans la détoxification et les défenses anti-oxydantes ont été identifiées dans le foie, ce qui confirme l'intérêt de cet organe dans des études ecotoxicoprotéomiques.

Conclusion

- L'électrophorèse en 2 dimensions est un outil assez puissant pour caractériser la fonction des organes en conditions normales, même chez le flet européen, espèce non modèle.
 - ➔ compte tenu des différences fonctionnelles entre organes il paraît important d'intégrer les études sur plusieurs organes pour avoir un aperçu de la réponse de l'organisme dans son ensemble aux contraintes environnementales.
 - ➔ Cette méthode est assez sensible pour détecter des différences fonctionnelles liées aux modifications post-traductionnelles ou à la présence d'isoformes.

- Ce travail préliminaire a permis de valider le potentiel de l'approche protéomique dans l'étude de la réponse des flets européens aux contraintes environnementales, et particulièrement la pollution chimique.

- ➔ L'électrophorèse en 2 dimensions présente l'avantage, par approche comparative, de permettre la détection simultanée de plusieurs protéines considérées comme biomarqueurs comme d'en identifier de nouvelles sans *a priori*
- ➔ La localisation sur les gels 2D et l'identification des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, les défenses anti-oxydantes, la détoxification permettra de suivre spécifiquement la dérégulation de ses voies métaboliques importantes dans la réponse aux perturbations environnementales dans leur ensemble.

Article 1: Towards a tissue proteome maps in the European flounder (*Platichthys flesus*)

Article en préparation

GALLAND Claire, (claire.galland@univ-brest.fr)

DUPUY Célie, (celie.dupuy@univ-brest.fr)

AUFFRET Michel, (michel.auffret@univ-brest.fr)

QUINIOU Louis, (louis.quiniou@univ-brest.fr)

LAROCHE Jean, (jean.laroche@univ-brest.fr)

PICHEREAU Vianney(vianney.pichereau@univ-brest.fr)

*Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, LEMAR UMR 6539 CNRS/UBO/IRD,
Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280
Plouzané, France*

Abstract

The European flounder *Platichthys flesus* is a fish species living in estuaries along the Atlantic north-east coast, and is heavily subjected to numerous stress factors such as salinity variations, hypoxia, temperature increase or chemical contamination both from natural and anthropogenic origins. It is thus considered as a sentinel species, and is used to monitor ecosystem quality or to investigate the mechanisms of response or adaptation to these stress factors. Global -omics studies, and especially proteomics, have been more and more used in this context. The aim of this study was to draw up the proteome map of 4 *P. flesus* tissues, ie the liver, the muscle, the gut and the kidney, that could have diverse roles and then could be complementarily studied in an organism integrated view. In all, we could map and identify 84 protein spots, some of them being specifically found in one tissue, while others were observed in several ones. This work allowed us to set up the basis towards further environmental proteomics studies.

Keywords

Proteome, flounder, organ, 2 dimensional electrophoresis, fish, teleost

Background

The European flounder, *Platichthys flesus*, is a catadromous fish species widely distributed from Norway to Portugal, spawning in winter in the mouth of the estuaries or at sea, displaying pelagic larvae, and living approximately two years in estuaries at the juvenile stage (Dando, 2011). Estuaries are very changing environment in salinity, temperature and oxygene concentration (Elliott and Whitfield 2011). Estuarine waters and sediments also accumulate xenobiotics such as heavy metals and organic contaminants, which degrade the overall quality of estuarine habitats for marine organisms (Courrat *et al.*, 2009).

P. flesus display a high capacity to adapt to changing environments characterized by reduced salinity, hypoxia, and variable temperatures (Larsen *et al.*, 2007; Hemmer-Hansen *et al.*, 2007; Evrard *et al.*, 2010; Marchand *et al.*, 2010). However, juvenile flatfishes are considered as particularly sensitive to pollutions that accumulate in sediments (Skerritt, 2010), and are considered as a valuable sentinel species often used to monitor estuarine water quality (Amara *et al.*, 2009; Lyons *et al.*, 2010; Leaver *et al.*, 2010).

In this kind of sentinel species, it is a challenging issue to define molecular biomarkers that reflect physiological changes of the organism in response to exposure to environmental chemicals (Peakall, 1994). To discover new biomarkers in such species, integrative strategies linking physiological phenotypes to proteomics-, transcriptomics- and metabolomics- data in both field- and experimental contamination- experiments are very promising approaches. In *P. flesus*, several recent studies, mainly based on transcriptomic approaches, dealt with stress and/or chemicals adaptation, and allowed to identify several molecular networks associated to environmental exposures (Evrard *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2003, 2007, 2008, 2011 ; Falciani *et al.*, 2008). However, it should be noted that (i) proteins are the direct effectors of the actual cellular and organism physiology (Tomanek, 2011), and (ii) it is acknowledged that transcriptomic data explain less than half of the variations in protein abundances (Feder and Walser, 2005), and (iii) all these studies were performed on a single tissue, the liver, which is quite limiting to understand the physiological changes at the organism level.

The proteomic knowledge of *P. flesus* is still extremely limited. Indeed, only one recent study compared the liver proteomes of fishes from 3 estuaries, and led to the identification of 6 proteins differentially accumulated in flounders from estuaries displaying contrasted degrees of pollution (Galland *et al.*, 2012). Besides, several recent studies underlined the need to study multiple organs to dress an integrated view of the whole organism functioning (Dowd *et al.*, 2010; Dowd, 2012; Abbaraju *et al.*, 2012). The liver is by far the organ of choice in

ecotoxicoproteomics and most of the proteomic studies were conducted on the liver by now (Dowd, 2012). A growing interest in the response of the kidney by 2-DE in recent studies (Chen *et al.*, 2009; Booth & Bilodeau-Bourgeois, 2009; Salbu *et al.*, 2008; Ripley *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2010). There is a lack of studies in the gut in an ecotoxicological context in spite of its potential role in xenobiotic food absorption. Muscle is also an organ of interest as it is available in quantity and easy to sample. In the present paper, we analyzed the proteomes of 4 tissues (the liver, the kidney, the gut and the muscle) of *P. flesus* by 2D electrophoresis, compared them and identified the most accumulated proteins in each tissue. In addition, considering the need to better characterize the physiology of this species in an environmental context, an objective was to evaluate the possibility to perform efficiently proteomics in spite of the overall lack of genomic data for this non-model fish species.

Results and discussion

2D electrophoresis and comparisons of tissue proteomes

P. flesus is an estuarine flatfish commonly used as a sentinel species to evaluate environmental pollution. As a consequence, there is an ecological issue to identify new biomarkers in this species. Juveniles (not sexually matures) flounders farmed in Danemark were acclimatized 2 weeks in the laboratory, and killed by cervical dislocation. Tissues were immediately frozen, and proteins from the 4 tissues were extracted and then separated by 2D-electrophoresis. Using the destreak reagent allowed us to obtain a good resolution both in the acidic and the alkaline sides of the gels. In all, using the Progenesis SameSpot software, we detected approximately 250 spots in the muscle electrophoregrams after Coomassie blue staining, and at least 450 spots in the electrophoregrams from other organs. The whole analysis was performed on approximately 650 spots. Representative gels are given in Figure 1.

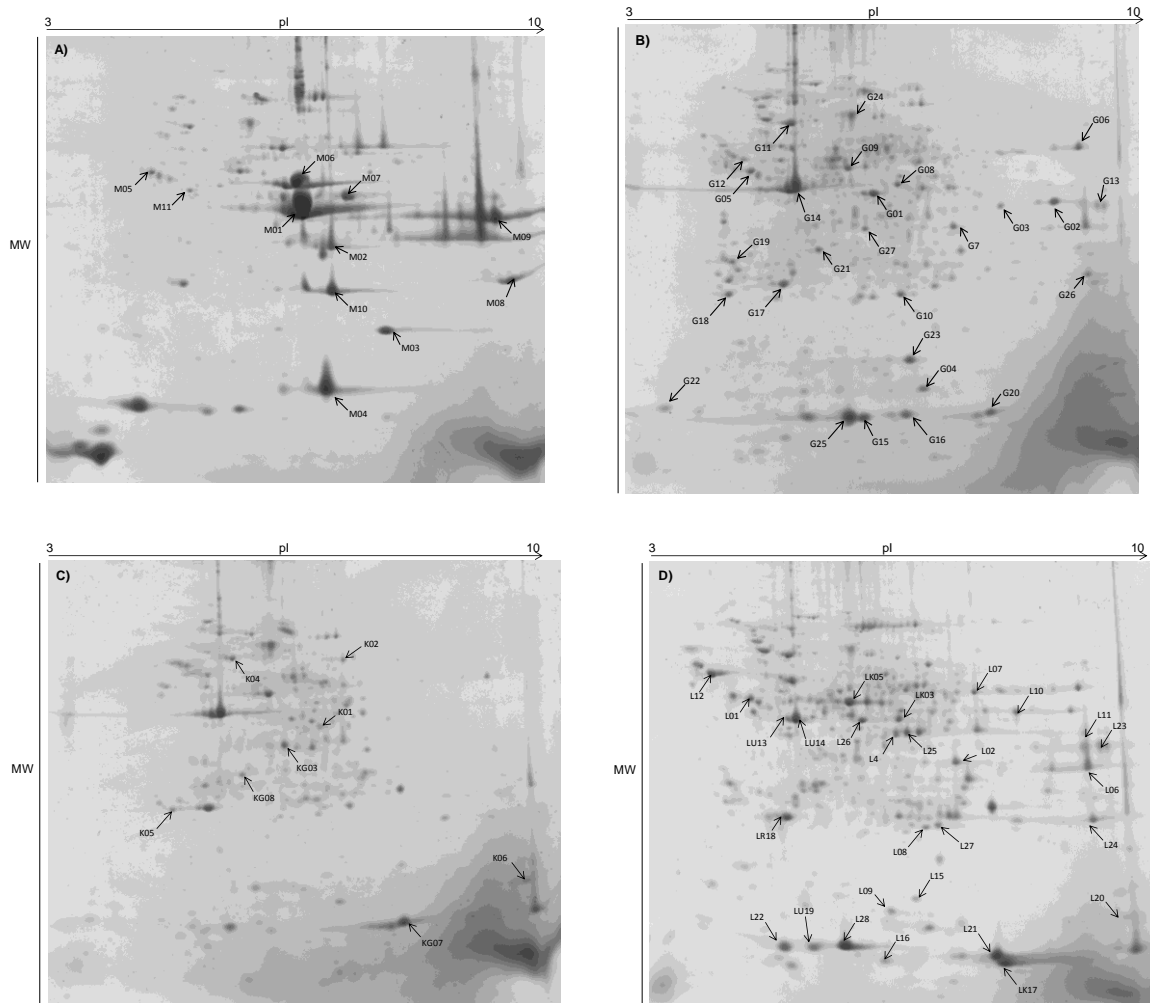


Figure 1: Representative 2-DE gels of proteins of 4 different organs (A) the muscle, (B) the gut, (C) the kidney, (D) the liver in the flounder *platichthys flesus*. The molecular weights (MW) and pI scales are indicated. Each gel is representative of two independent replicates.

The skeletal muscle proteome appeared clearly different from those of digestive organs. Indeed, it revealed dominated by a few but abundant proteins whereas protein patterns of digestive organs were characterized by a high number of low abundance proteins. This profile is consistent with the ones observed in other fish muscles (Abbaraju *et al.*, 2012; Bosworth *et al.*, 2005; McLean *et al.*, 2007). Statistical analysis of data confirmed that the muscle proteome clearly differed from the three others. Indeed, principal component analysis and hierarchical clustering showed that muscle gels belonged to a distinct group (Figure 2). On the contrary, this statistical analysis allowed to show that the gut and kidney proteomes were clustered together.

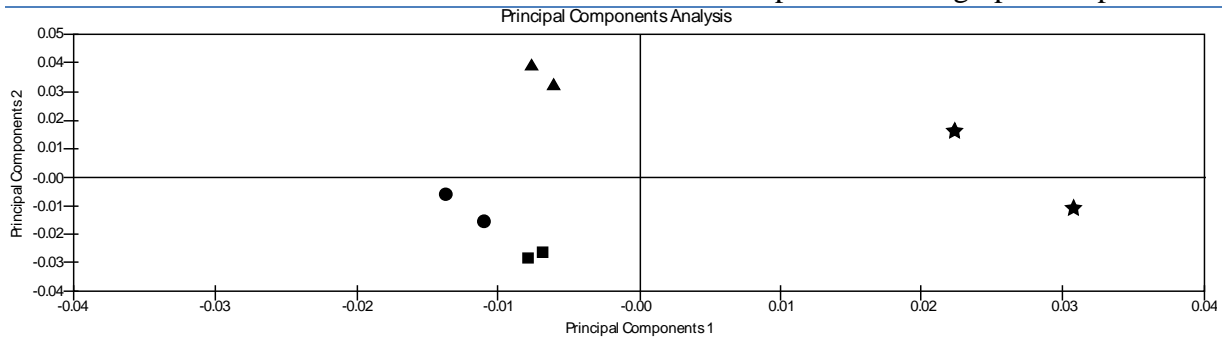


Figure 2 : Principle component analysis of the different protein patterns (Progenesis sameSpot analysis software) in the liver (triangle), the Muscle (stars), the kidney (squares) and the gut (circle).

Identification of proteins

For each organ, the most intense spots were excised, trypsinolysed and analyzed by MALDI TOF/TOF mass spectrometry (tableau 1). In all, we excised a total of 170 protein spots. The resultant mass spectra were searched against different ESTs databases, ie a vertebrate- and a *P. flesus*-ESTs database. We could identify 11 out of the 31 excised spots in the muscle, 27 out of 40 in the gut, 8 out of 38 in the kidney and 28 out of 61 in the liver. These results corresponded to identification rates of 36%, 68%, 21%, and 46% in the muscle, the gut, the kidney and the liver respectively and a global identification rate of 44%. It is noteworthy that such identification rates are convergent with those described in other proteomic studies of other non model fishes (Forne *et al.*, 2010; Dowd, 2012). This low identification rate may have several explanations. The first one concerns the lack of sequence data for non-model organisms. We slightly reduced this problem by using the PEAKS software, that also consider *de novo* sequences in searching databases. The second one, in our experiments, concerned a small proportion of samples that gave poor mass spectra with few peaks and a low signal to noise ratio. This concerned mainly lower abundance proteins.

Overall, 84 protein spots could be unambiguously identified. In a number of cases, we re-identified several times the same protein. For example, some spots migrating at the same position in different gels we spotted and gave, expectedly, the same protein identification (see for examples the identification of spots G17 and LK18; G7 and L2, M4 and G4, M5, L1 and G5; G8 and LK3; LK5 and G9; L21, H7 and G20; G14 and LU14). We also could identify several times the same protein in protein spots migrating at different positions. For example, Creatine kinase was identified in the most abundant spot in the skeletal muscle proteome (spot M1), but was also identified in the kidney- and gut- proteomes, in spots K1 and G1, and in

spots G2 and G3. Similar observations of protein redundancy and multiplicity were already made in other studies. For example, Abbaraju *et al.* (2012), who analyzed the tissues proteomes of *Fundulus grandis*, could identify 12 creatine kinases and 6 alpha-actins in the skeletal muscle proteome. Those redundant identifications could correspond to different alleles, splice variants, posttranslational modifications, or degradation products (Abbaraju *et al.*, 2012). In our gut proteome, G1, G2 and G3 could correspond either to different protein isoforms of creatine kinase, or to different post-translationally modified forms of the proteins. In particular, G3, which displayed the same MW as G2, but a slightly more acidic pI, could correspond to a phosphorylated form of G2. A similar hypothesis could be evoked for G11 and K4, that were spotted in different gels and both were unambiguously identified as a Heat Shock Cognate 71 kDa protein (HSC71). G11 appeared in fact slightly more acidic than K4, suggesting that this last protein could be a phosphorylated form of HSC71. Interestingly, comparing the normalized spot volumes in the different organs, we observed a balance between the two forms in the three digestive organs analyzed. Indeed, the K4 form was dominant in the kidney, whereas the G11 form dominated in the gut- and liver- proteomes (Figure 1 and 3). As the phosphorylation state of this kind of protein is known to modulate its function, this observation could reflect different states and give insights towards biological functions in the different organs.

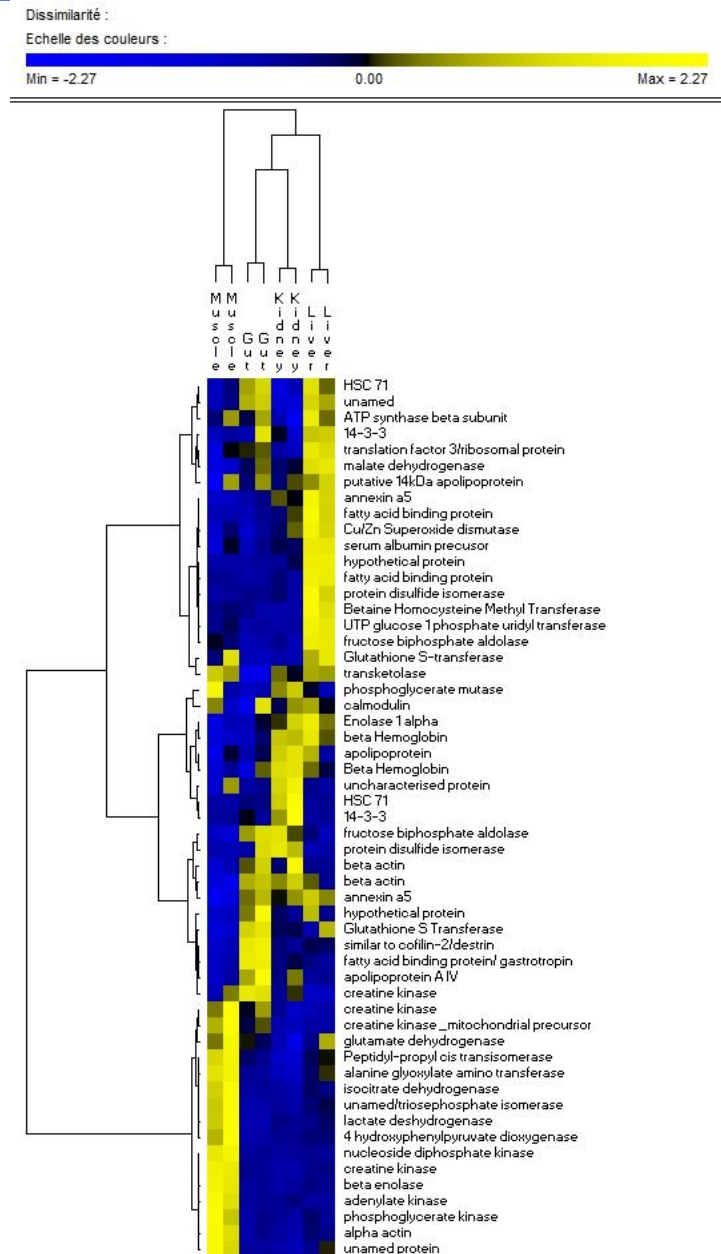


Figure 3 : Hierarchical clustering of identified proteins based on spots normalized volumes given by the Progenesis Samespot software (Nonlinear dynamics) (Pearson correlation followed by Ward aggregation method, Permut matrix software).

From identifications to biological functions

In this study, we aimed at identifying the most abundant proteins in four *P. flesus* tissues. Considering the total normalized volumes of the identified protein spots, we determined that they represented 25.4-, 23.8-, 19.5-, and 23.9- per cent of the total normalized volumes of

proteins measured in the skeletal muscle, the gut, the kidney and the liver, respectively. We classified the identified proteins according to their postulated biological functions (figure 4).

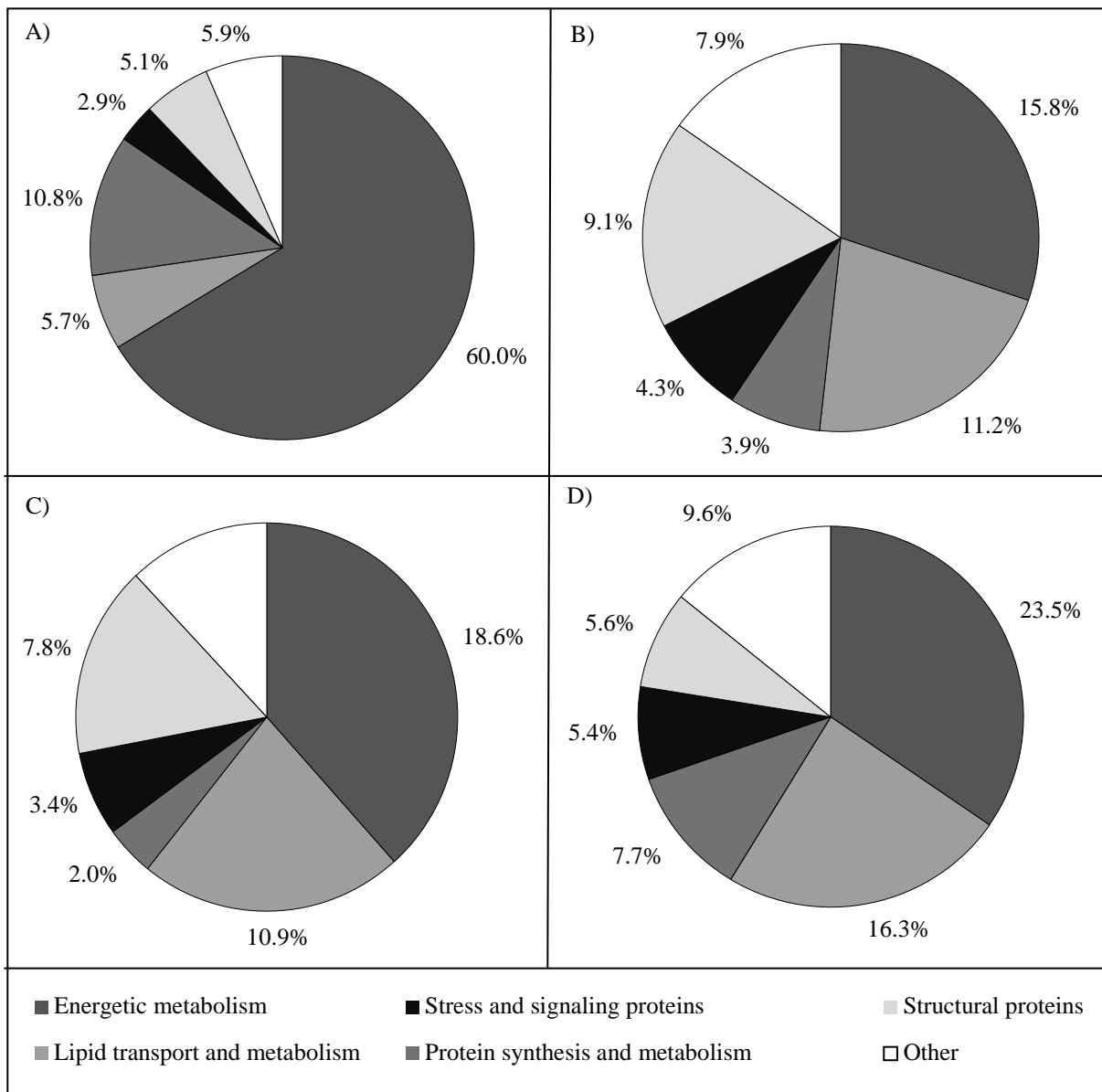


Figure 4 : Part represented by energetic metabolism, lipid transport, stress proteins or other identified proteins on the amount of identified proteins (expressed in spot normalized volume given by the Progenesis Samespot software, Nonlinear dynamics) in A) the muscle, B) the gut, C) the kidney and D) the liver.

A first examination of the roles of proteins identified showed that most of them were implied in the energetic metabolism (ie, including proteins involved in glycolysis, Krebs cycle and mitochondrial oxidative phosphorylation). Four other categories revealed highly represented, ie, lipid transport and metabolism, stress response and signaling, protein synthesis and metabolism and structural proteins. All other proteins were categorized as other function. As previously observed with hierarchical clustering using the whole dataset, distribution of categories in the skeletal muscle proteome revealed clearly different from that of other organs.

Indeed Figure 4 showed that 60% of normalized volumes of identified proteins was attributed to energetic metabolism proteins, while this category ranged from 15 to 23% in other tissues. Reciprocally, proteins involved in lipid transport and metabolism represented 10 to 16% in the digestive tissues, and only 5% of the proteins identified in the skeletal muscle. Stress and signaling proteins ranged from 2.9 to 5.4% of the identified proteins, structural proteins from 5 to 7.9% and protein synthesis and metabolism from 2 to 10%. The kidney and the gut revealed very poor in proteins implied in protein synthesis and metabolism on the contrary to the muscle and the liver. It should also be noted that the liver, in which 9.6% of the identified proteins were assigned to other functions (this category ranged from 5.8 to 7.9% in other tissues), revealed the most diversified organ on a metabolism point of view. It should especially be noted that all of the proteins implied in oxidative stress or detoxification were identified in the liver, and so belong to the majoritary proteins in this tissue, thus underlying its interest for ecotoxic-proteomics studies.

Migration characteristics and relative abundances of individual protein spots may also give insights about organs functioning. The heatmap given in Figure 3, comparing normalized volumes of the identified spots in each tissue, clearly showed that they were preferentially accumulated in one or two tissues. This is also the case for proteins identified in several spots that should correspond to different protein isoforms or to differentially post-translationally modified proteins, as previously evoked for HSC71 or for creatine kinases. Further analyses will be necessary to understand the physiological consequences of such biochemical changes.

Our results showed that a high proportion of proteins in the skeletal muscle are involved in the energetic metabolism, and these proteins also belonged to the most accumulated ones in the three other tissues. In all, 3 of the identified spots were proteins implied in the preparatory phase of glycolysis (M9, M10, KG3), 5 in the pay-off phase of glycolysis (M6, M7, M8, G9, LK5), 6 in anaerobic energy production (ie, creatine kinases M1, G1, G2, G3, K1 and LDH, M2), 1 in the pentose phosphate pathway (K2), 5 in the Krebs cycle (G7, G8, L2, LK3) and associated metabolism (G6), 3 in the maintenance of the equilibrium between nucleosides phosphates (M3, M4, G4), and 3 were beta subunits of ATP synthase (M5, L1, G5). After gels alignment and proteins identification, some of these proteins appeared clearly the same (eg, NDK in M4 and G4; ATP synthase in M5, L1 and G5; MDH in G7 and L2; IDH in G8 and LK3; ENO in LK5 and G9; β -Hb in L21, G7 and G20; β -actin in G14 and LU14; apolipoprotein in LK18 and G17), but others obviously corresponded to distinct isoforms (eg, M6 is a beta enolase only expressed in skeletal muscle, whereas LK5 and G9 corresponded to an alpha enolase). Energy production is one of the most important function in living cells, and

is often found to be modulated by environmental conditions. Studying how do environmental parameters impact this kind of cellular function is best achieved by integrating strategies such as metabolomics and fluxomics to proteomics approaches. However, the fluxes in a metabolic pathway are correlated to the activity of its enzymes, which is itself modulated by protein abundance, modifications or the use of different isoforms of enzymes.

As evoked above, our results suggest that energetic metabolism is largely more active in the skeletal muscle than in other organs. However, it should be kept in mind that spot volumes were normalized relatively to the total amount of proteins in samples. As a consequence, it is obviously contestable to compare different tissues that do not express a similar background of housekeeping proteins. However, mapping these proteins will allow us, in future experiments, to make a more precise idea of how do evaluate the energetic metabolism in response to environmental perturbations, in a given tissue.

Concluding remarks

Proteomics is a powerful tool that gave important results in the understanding of the response mechanism of organism subjected to environmental constraints, even in non-model species such as the European flounder *P. flesus* (Sanchez *et al.*, 2011; Tomanek, 2011). We recently analyzed the liver proteome phenotypes of 3 natural populations of this species living in different estuaries contrasted in their contamination levels (Galland *et al.*, 2012). The main limitation of this technique is the poor identification rates of proteins, mainly due to the lack of genomic data in such organisms. In this paper, we mapped the most abundant proteins in the proteomes of 4 tissues of *P. flesus*. This kind of study, while descriptive, will be of particular value for future proteomics studies of this species. Indeed, we could evaluate and improve our rates of identification, and identify the most abundant proteins in each tissue, reflecting the probably most active metabolisms in each of them. For example, the mapping of several proteins involved in the metabolism known to be involved in response to adverse condition such as energetic metabolism detoxification, oxidative stress (van der Oost *et al.*, 2003) will allow us to follow their evolution under adverse conditions in a targeted and specific way. Furthermore, comparative proteomics by 2-DE is a global and without *a priori* approach aiming at identifying differentially expressed proteins. It then allows the simultaneous detection of several markers that can be related to different metabolism and are already known as biomarkers of environmental perturbation. It also allows the detection of

unexpected proteins bringing many important information to fundamentally improve our understanding of animal physiology which could be a first step toward the identification of potential new biomarkers.

Materials and Methods

Animal sampling

Juveniles of *P. flesus* (cohort 0+) were purchased in a fish farm (Fishlab, Danemark) in October 2010, then reared in our laboratory in experimental tanks, the water being directly collected in the Bay of Brest (salinity ≈ 35 g/l, $14^{\circ}\text{C} < \text{temperature} < 17^{\circ}\text{C}$). Fishes were then fed with Commercial food (Inicio plus, 1.9 mm), obtained from Biomar (France), consisted of a formulated feed containing 61% crude protein and 33% crude fat. After 14 days acclimation, animals were sacrificed just after capture by cervical dislocation. Livers, muscles, kidney and gut were taken up and immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . The gut was washed with deionized water before being frozen.

Visual inspection did not reveal any trace of liver pathology or parasite infection. All experiments were performed according to the guidelines laid down by the french "Ministère de l'Agriculture" and the European Union council directive for the care and use of laboratory animals.

Proteomic analysis

The proteomic analysis was conducted as described in Galland *et al.* (2012). Briefly, frozen organs were homogenized in 1 ml Tris-HCL buffer (100 mM, pH 6.8) containing 1% Protease Inhibitor Mix (GE Healthcare), using ultraturrax. The supernatants were removed by centrifugation (12 000 g, 15 min, 4°C) and then incubated at ambient temperature for 30 min with 1% DNase mix (GE Healthcare). Total protein contents were determined using DC protein assay kit (biorad) in triplicate.

The volume corresponding to 500 μg of proteins was concentrated by TCA (10%, v/v) precipitation. Protein pellets were dried in air, and then resuspended in 250 μl of Destreak Rehydration Solution (GE Healthcare) containing 1% IPG buffer pH 3-10 (GE Healthcare).

2-Dimensional Electrophoresis (2-DE) analysis.

The proteins from 2 animals were individually loaded on linear pH 3-10 gradient IPG strips (13 cm, GE Healthcare). IEF was performed in an Ettan IPGphor III isoelectric focusing

system (GE Healthcare), followed by strips equilibration for 15 min first in a DTT (1%) solution and then in a iodoacetamide (260 mM) solution as described in Galland *et al.* (2012).

The second dimension was performed in 10-15% gradient polyacrylamide gel, as described in Budin-Verneuil *et al.* (2007). Proteins were revealed by incubating gels in 0.1% Coomassie blue staining solution (PhastGel Blue R-350 GE Healthcare) overnight, followed by washing in a methanol - acetic acid - water (30/7/63 : v/v/v) solution.

Mass spectrometric analysis. Highly abundant spots were selected and manually excised from 2-DE gels, and proteins were in-gel trypsinolyzed as described in Budin-Verneuil *et al.* (2007). Briefly, gel pieces were first washed in 50 mM ammonium bicarbonate (BICAM), and then dehydrated in 100% acetonitrile (ACN). Gel pieces were vacuum dried, and rehydrated with BICAM containing 0.5 µg trypsin (Promega), and incubated overnight at 37°C. Peptides were extracted from the gels by alternative washing with 50 mM BICAM and ACN, and with 5% formic acid and ACN. Between each step, the supernatants were pooled, and finally concentrated by evaporation using a speed vac (45°C). Samples were then resuspended in TFA (0.1% in water). Peptides solutions were mixed with the α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA, 10 mg/ml of a ACN/TFA/water (60/4/36 : v/v/v) solution), and spotted on a polished steel MALDI target using the dried droplet method. Peptides were then analysed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight tandem mass spectrometry (MALDI TOF-TOF) in positive ion reflector mode, using an Autoflex III (Bruker Daltonics) mass spectrometer. The flexControl software (v3.0, Bruker Daltonics) was programmed to acquire successively PMF spectra and MS/MS from the dominant peaks.

Proteins identification. Mass spectrometric data were analyzed by using the Peaks software (Bioinformatics Solutions) for MS/MS-based identification and *de novo* sequencing. The search parameters allowed for one trypsin miscleavage, oxidation of methionine, carbamidomethylation of cysteine and at least 100 ppm mass accuracy. We used three different databases; a NR protein database, and 3 ESTs databases, which contained ESTs of vertebrates or a one containing only the *Platichthys* ESTs sequenced to date or another customized base containing fish EST sequenced to date. The best results were obtained with the fish ESTs database, using the Peaks software. All sequence tags obtained were submitted to homology searches using the Blast algorithm available at www.ncbi.nlm.nih.gov.

Statistical analysis. 2D-Gels were compared with progenesis sameSpot software. Normalized volumes given for each spots were reduced and centered and then used to build heat map thanks to PermutMatrix program (Caraux and Pinloche, 2005), using Pearson distance followed by the Ward aggregation method as advised in Meunier *et al.* (2005).

Acknowledgments

We thank Mehdi Taiya (MS platform, UBO) and Carole Capitaine (UBO) for their help. This work is part of-, and is funded by- the European Interreg IVa France (Channel) / England program, and the French ONEMA (office national de l'eau et des milieux aquatiques).

Tableau 1: Identification of proteins of *P. fesus* muscle (M), gut (G), kidney (K) and liver (L)¹.

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
M1	Muscle type creatine kinase	Energetic metabolism	<i>Oryzias latipes</i>	gi 187463265	GFTLPPHNSR LGSSEVDQVQLVVDGVK GTGGVDTASVGGVFDISNADR FEEILTR	20.2	98.3	43.7	6.7
G1	Creatine kinase B	Energetic metabolism	<i>Dissostichus mawsoni</i>	gi 193266303	GGDDLDSYVLSSR GTGGVDTAAVGGVFDISNADR RGTGGVDTAAVGGVFDISNADR	20.9	95.5	45.1	6.7
G2	Creatine kinase, ubiquitous mitochondrial precursor	Energetic metabolism	<i>Papio anubis</i>	gi 213464495	LGYILTCPSNLGTGLR GTGGVDTAATGGVFDISNLDR	30.9	68.7	42.6	8.6
G3	Creatine kinase	Energetic metabolism	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	gi 166851510	GTGGVDTAAVGGTFDISNLDR	14.8	62.7	42.0	8.6
K1	Creatine kinase	Energetic metabolism	<i>Ictalurus punctatus</i>	gi 224237845	GGDDLDPNYVLSSR GTGGVDTASVGGVFDISNADR	13.9	83.8	42.6	7.0
M2	Lactate dehydrogenase-A	Energetic metabolism	<i>Oryzias latipes</i>	gi 187406460	VIGSGTNLDSAR GEAMDLQHGAFLK GEAMDLQHGAFLK	10.4	63.0	37.3	6.0

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
M3	Adenylate kinase	Energetic metabolism	<i>Gadus morhua</i>	gi 226221852	GFLIDGYPR YGYTHLSSGDLLR IIFVVGGPGSGK	22.9	97.3	24.5	6.9
M4	Nucleoside diphosphate kinase	Energetic metabolism	<i>Siniperca chuatsi</i>	gi 251759904	GDLCINIGR MMLGETNPADSKPGSIR	19.6	96.5	22.7	7.6
G4	Nucleosidediphosphate kinase B	Energetic metabolism	<i>Ratus norvegicus</i>	gi 207988783	TFIAIKPDGVQR VMLGETNPADSKPGTIR	21.1	86.7	16.8	7.1
M5	ATP synthase beta subunit	Energetic metabolism	<i>Ictalurus punctatus</i>	gi 204214387	IPVGPETLGR AHGGYSVFAGVGER VALVYGQMNEPPGAR LVLEVAQHLGESTVR GQKVLDTGAPIR IMNVIGEPIDER VALVYGQMNEPPGAR	32.6	93.1	52.8	5.1
L1	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Energetic metabolism	<i>Danio rerio</i>	gi 66773080	IPVGPETLGR VVDLLAPYAK GQKVLDTGAPIR VALVYGQMNEPPGAR IMDPNIVGTEHYDVAR AIAELGIYPAVDPLDSTSR	24.4	92.2	52.0	5.2

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
G5	Mitochondrial ATP synthase beta subunit	Energetic metabolism	<i>Ictalurus punctatus</i>	gi 204159543	IPVGPETLGR GQKVLDTGAPIR AHGGYSVFAGVGER VALVYGQMNEPPGAR LVLEVAQHLGESTVR	32.7	80.2	50.5	5.3
G6	Glutamate dehydrogenase	Energetic metabolism	<i>Osmerus mordax</i>	gi 253750193	NLNHVSYGR QGGPIPVVPTADFQAR	25.4	68	54.4	8.9
G7	Malate deshydrogenase 1a NAD soluble	Energetic metabolism	<i>Danio rerio</i>	gi41053939	VVDGLSINDFSR	10.8	68.8	37.8	7.5
L2	Malate dehydrogenase 1a, NAD soluble	Energetic metabolism	<i>Danio rerio</i>	gi 41053939	VVDGLSINDFSR MDATAAEELVEER DLDAAILVGSMR	12.1	71.3	28.7	7.5
G8	Isocitrate dehydrogenase	Energetic metabolism	<i>Sparus aurata</i>	gi 189243206	TVESEAAHGTVTR	7.8	60.6	47.0	6.9
LK3	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Energetic metabolism	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	gi 47217126	HAHGDQYK TVESEAAHGTVTR NILGGTVFR	7.3	9.2	47.8	6.9

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
K2	Transketolase protein	Energetic metabolism	<i>Dissostichus mawsoni</i>	gi 193254891	AIPTCTVFYPSDAVSTER	13.8	60.8	64.5	7.0
L4	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Energetic metabolism	<i>Danio rerio</i>	gi 41054723	NNHFGFGAGNFK	3.1	60.8	44.4	6.8
M6	Beta enolase	Energetic metabolism	<i>Pimephales promelas</i>	gi 282847225	IGAEVYHNLK AAVPSGASTGVHEALELR DVILPVPAFNVINGGSHAGNK	22.5	98.1	51.5	5.3
LK5	Enolase 1 alpha	Energetic metabolism	<i>Platichthys flesus</i>	gi 260099280	LADLYMSFVK MAQSNGWGVMSHR FTAGTSIQVVGDDLTVTNPK	21.3	82.4	52.3	6.3
G9	Alpha enolase	Energetic metabolism	<i>Sebastes dschlegeli</i>	gi 315670600	AAVPSGASTGIYEALRL LAMQEFMILPVGASTFK	13.1	80.1	51.2	6.3
M7	Phosphoglycerate kinase	Energetic metabolism	<i>Oreochromis mossambicus</i>	gi 253879995	ATQEQIDSFR VLNNMEIGTSLYDEEGAGIVK LGDVYVNDAFGTAHR AHSSMVGVNLPQK	28.3	97.7	47.1	5.5
M8	Phosphoglycerate mutase 1	Energetic metabolism	<i>Gadus morhua</i>	gi 226206799	HGESVWNQENR	8.2	60.8	33.1	6.3

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
M9	Fructose-bisphosphate aldolase A	Energetic metabolism	<i>Siniper</i> <i>cachuatsi</i>	gi 251758231	FQSINAENTEENR FQSINAENTEENRR GVVPLAGTNGETTTQGLDGLYER	24.3	97.6	42.6	8.9
KG3	Fructose-bisphosphate aldolase C	Energetic metabolism	<i>Ictalurus</i> <i>punctatus</i>	gi 200974245	QLLFTADER RFSSVFSTPMGFRR GVVPLAGTNGETTTQGLDGLSER	19.3	31.3	39.2	6.4
M10	Triosephosphate isomerase B	Energetic metabolism	<i>Pimephales</i> <i>promelas</i>	gi 282845130	HVFGESDELIGQK VVLAYEPVWAIGTGK DVDGFLLVGGASLKPEFIEIINAK	28.9	98.8	22.0	6.4
L7	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Energetic metabolism	<i>Oryzias latipes</i>	gi 187642488	SFNNAMGVNVPR GGTLIQYEDHLR	8.5	63.8	52.8	7.7
L20	Hemoglobin subunit alpha	Energetic metabolism	<i>Platichthys</i> <i>flesus</i>	gi 260099292	TYFSHWADLSPSSAPVR YSELHAFK	32.9	89.2	16.2	9.3
K6	Hemoglobin subunit alpha	Energetic metabolism	<i>Platichthys</i> <i>flesus</i>	gi 260099292	SDVIGAEALGR TYFSHWADLSPSSAPVR YSELHAFK	32.9	90.9	18.4	9.2
L21	Beta hemoglobin	Energetic metabolism	<i>Platichthys</i> <i>flesus</i>	gi 260099289	FLSVVVSALGR IDVGEIGPQALTR GVYSALSTMHSEK	43.0	97.1	13.5	7.8

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
KG7	Hemoglobin beta	Energetic metabolism	<i>Platichthys flesus</i>	gi260099289	FLSVVVSALGR IDVGEIGPQALTR FGPSVFTAQVQEAQK HFSTFGDLSTTAAILGSEK	55.2	98.6	13.9	7.8
G20	Beta hemoglobin A	Energetic metabolism	<i>Seriola quinqueradiata</i>	gi 6230890	LHVDPDNFR FLSVVVSALGR IDVGEIGPQALTR	22,4	94,4	14.5	8.0
L8	Glutathione S-transferase alpha	Stress responsive protein	<i>Pseudopleurone ctes americanus</i>	gi 27497547	VVLTYFDGR	17.6	34.8	28.4	6.8
G10	Glutathione S-transferase alpha	Stress responsive protein	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	gi 193888535	VVLTYFDGR	8.8	51.1	31.8	6.9
L9	Cu/Zn superoxide dismutase	Stress responsive protein	<i>Platichthys flesus</i>	gi78230468	NHAGPTDADR GAGETSGTVHFEQESDSAPVK	64.0	20.17	18.7	6.7
K4	Heat shock cognate 71 kDa protein	Stress responsive protein	<i>Salmo salar</i>	gi 223574976	FEELNADLFR TTPSYVAFTDSER STAGDTHLGGEDFDNR TVNNAVVTVPAYFNDQSR	20.1	98.2	62.4	5.6

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
G11	Heat shock cognate 71 kDa protein	Stress responsive protein	<i>Salmo salar</i>	gi 223574976	FEELNADLFR TTPSYVAFTDSER STAGDTHLGGEDFDNR TVNNNAVVTVPAYFNDSQR	20.1	96.2	64.5	5.8
L10	Betaine homocysteine s-methyltransferase	Amino-acid metabolism	<i>Platichthys flesus</i>	gi 260099592	AGPWTPEATVTHPEAR	17.3	9.5	49.8	8.1
L11	Alanine glyoxylate aminotransferase	Amino acid metabolism	<i>Platichthys flesus</i>	gi 60417200	YLFPGGPSNVPPR ALNAPPGTAPISFNR	10.5	17.8	44.4	8.9
L12	Protein disulfide isomerase	Protein metabolism	<i>Oreochromis niloticus</i>	gi 253904512	VDATEETELAQEYGVR	7.8	60.8	63.5	4.9
G12	Protein disulfide-isomerase	Protein metabolism	<i>Oreochromis niloticus</i>	gi 253904512	VDATEETELAQEYGVR	7,8	60,8	53.6	5.2
L23	Peptidyl-prolyl cis-transisomerase FKBP4	Protein metabolism	<i>Ovis aries</i>	gi 229634366	YTMECSPFSMR	5.9	60.8	41.9	9.0
L24	Ribosomal protein l22	Protein metabolism	<i>Poeciliopsis presidionis</i>	gi 322809993	LFFFRYFLVRYFR	8.5	7.9	29.9	8.9
M11	Alpha actine	Structure protein	<i>Platichthys flesus</i>	gi 84117832	GYSFVTTAER SYELPDGQVITIGNER	17.7	83.8	43.8	5.4

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
G13	Alpha actin	Structure protein	<i>Ictalurus punctatus</i>	gi 224234035	QEYNEAGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER	11.3	74.5	46.4	5.8
LU13	Beta actin	Structure protein	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	gi 12240086	GYSFTTTAER SYELPDGQVITIGNER	18.3	63.8	47.1	5.6
LU14	Beta actin	Structure protein	<i>Sparus aurata</i>	gi 320025279	GYSFTTTAER QEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK DLYANTVLSGGTTM(+16)YPGIADR	25.0	98.5	47.0	5.7
G14	Beta actin	Structure protein	<i>Gadus morhua</i>	gi 295340775	GYSFTTTAER AVFPSIVGRPR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK SVRIFMR AGFAGDDAPR	25.6	97.6	46.4	5.8
L15	Destrin	Structure protein	<i>Macaca mulata</i>	gi 73696362	YALYDASFETK	10.5	60.8	18.3	6.9
L16	Fatty acid binding protein	Lipid transport and metabolism	<i>Platichthys flesus</i>	gi260099302	DIKPITEIK	5.6	60.7	12.9	6.6

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
G15	Intestinal fatty acid-binding protein	Lipid transport and metabolism	<i>Paralichthys olivaceus</i>	gi 215385048	NENYDKFMEK ITIEQTGDKFHIK VDRNENYDKFMEK AVVGGELVQSYNYEGVDAK	21.2	95.8	13.9	6.6
LK17	Fatty acid-binding protein	Lipid transport and metabolism	<i>Ictalurus punctatus</i>	gi 204254140	KMAFSGTWQVYSQENYEEFLR	16.3	60.7	14.2	8.0
G16	Fatty acid binding protein 6	Lipid transport and metabolism	<i>Solea senegalensis</i>	gi 213043848	WETETQEGYDEFCK	9.0	50.1	14.5	7.0
LK18	Apolipoprotein AI precursor	Lipid transport and metabolism	<i>Platichthys flesus</i>	gi78229779	EMATPYVEEYKDQLK VITEHIEEYR VLDQLDQTEYSELK	17.0	85.7	30.5	5.6
G17	Apolipoprotein AI precursor	Lipid transport and metabolism	<i>Platichthys flesus</i>	gi 60417202	TALMPIESVR VITEHIEEYR VITEHIEEYRR VITEMFEAIAATFQK VLDQLDQTEYSELK EMATPYVEEYKDQLK ALQSSVIPITDNVVTIADATAEFR	34.2	98.9	29.6	5.7

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
LU19	Putative 14 kDa apolipoprotein	Lipid transport and metabolism	<i>Platichthys flesus</i>	gi109177570	VGHGLVEEAGPLVDK	6.0	60.8	14.4	5.9
G18	Apolipoprotein A-IV precursor	Lipid transport and metabolism	<i>Sparus aurata</i>	gi 237697376	QELAPYADSLDSEALR	7.6	60.8	28.8	5.1
L22	Serum albumin precursor	Lipid transport and metabolism	<i>Bos taurus</i>	gi 259088501	HPEYAVSVLLR RHPEYAVSVLLR LGEYGFQNALIVR DAFLGSFLYEYSR KVPQVSTPTLVEVSR	29.4	89.6	14.4	5.5
G19	14-3-3 protein beta/alpha-1	Signaling	<i>Veras pervariiegatus</i>	gi 238859516		3.0	8.1	33.6	5.1
K5	14-3-3 protein beta/alpha	Signaling	<i>Oryzias latipes</i>	gi 255382473	DMQPTHPIR DSTLIMQLLR AVTEQGLELSNEER DTVENSQQAYQDAFDISK KDTVENSQQAYQDAFDISK	22.9	82.9	29.2	5.0
G22	Calmodulin	Signaling	<i>Peromyscus maniculatus</i>	gi 219629891	VFDKDG DGYISAAELR	11.2	26.8	15.3	4.5

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
KG8	Annexin a5	Other	<i>Perca flavescens</i>	gi 226339569	FGTDEQSFVTILGNR GAGTDDDTLIR	13.3	62.4	34.6	5.9
G21	Annexin A5	Other	<i>Oreochromis niloticus</i>	gi 253877983	FGTDEQSFVTILGNR	18.0	60.8	34.6	6.0
G23	Similar to Cofilin-2	other	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	gi 193888643	KAQANEEEEKR SIVIDDEQEILQGDVGTK	33.1	71.8	18.6	7.0
L25	Unnamed protein (Ig)		<i>Macaca fascicularis</i>	gi 186712935	EDAEHAIR	2.0	59.9	45.1	6.9
L26	Hypothetical protein CBG07423		<i>Caenorhabditis briggsae</i>	gi 268581531	TKIIWVQWSTIR	2.3	60.8	47.7	6.8
L27	Unnamed protein product		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	gi27380292	LAEHILEAAPK	4.2	60.6	28.6	7.1
L28	C1orf174		<i>Oncorhynchus mykiss</i>	gi 213128149	KQMSSRVSNLK	4.0	12.7	14.4	6.2
G24	Uncharacterized protein C4orf32-like		<i>Oryzias latipes</i>	gi187498457	YLVHLQKSVAMR	7.7	60.8	68.7	6.4

Spot no.	Identification	Function	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Peaks score (%)	MW _{obs} (kDa)	pI _{obs}
G25	Unknown protein		<i>Petromyzon marinus</i>	gi 166887580	LVLQKSTGR	3.3	60.7	12.9	6.4
G26	Eukaryotic translation initiation factor 3		<i>Poeciliopsis turneri</i>	gi 322811853	QMGYQCFLNFFDLR	5.7	10.7	29.0	9.0
G27	Unknown protein		<i>Rattus norvegicus</i>	gi 298975514	CFICTFLMLSLYIECPK	8.1	60.8	37.8	6.59

¹Proteins were excised from the 2-DE gels, trypsinolyzed, and the resulting peptides were sequenced by using MALDI TOF-TOF mass spectrometry. Spectra analysis was performed using the PEAKS Software. The score and the coverage were those given by the PEAKS software, using the search parameters described in the Materials and methods section.

Chapitre 3 :

Réponse du Flet Européen *Platichthys flesus* à la
contamination chimique par un mélange de HAP et PCB :
approche expérimentale

Introduction

- Les HAP sont issus de la combustion et des activités industrielles. Les PCB sont utilisés comme retardateurs de flamme et dans les peintures. HAP et PCB sont persistants dans l'environnement. Il est donc important d'étudier leurs effets sur les organismes
- Des études protéomiques ont étudié les effets des HAP et PCB sur les organismes marins, mais peu se sont intéressées à des cocktails de polluants. Pourtant, les effets combinés de plusieurs molécules peuvent être différents de la somme des effets de molécules prises indépendamment.
- Depuis les 10 dernières années, l'écotoxicoprotéomique est une approche émergente de l'étude des effets des polluants sur les organismes. Elle présente l'avantage de permettre la détection de plusieurs marqueurs simultanément. Elle permet de mieux comprendre les mécanismes de réponse aux contraintes environnementales comme d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels.
- La protéomique en électrophorèse à 2 dimensions ne permet d'avoir une idée que de l'accumulation des protéines. Des études complémentaires permettent de mieux comprendre les mécanismes de régulation de leur synthèse (transcriptomique) et leur activité. Des études par biomarqueurs ont montré l'importance du système immunitaire, du métabolisme énergétique et de la détoxification dans la réponse aux HAP et PCB. L'étude des effets immunomodulateurs des contaminants chimiques est particulièrement importante. Une immunodépression peut en effet avoir un impact direct sur la capacité des organismes à répondre à une attaque pathogène et compromettre leur survie. Le métabolisme énergétique joue un rôle de pivot dans la réponse aux xénobiotiques. Les mécanismes de détoxification présentent un coût énergétique. L'individu doit donc faire des compromis dans l'allocation de ses ressources entre différentes fonctions dont le système immunitaire.

L'objectif de cette étude est d'étudier la réponse du flet européen *Platichthys flesus* à une contamination expérimentale par un cocktail de HAP et PCB. 2 approches complémentaires sont utilisées : une approche globale et sans *a priori* par électrophorèse en 2 dimension et une approche par biomarqueurs.

Les résultats de l'étude protéomique et de l'étude par biomarqueurs sont présentés et discutés en détail et indépendamment respectivement dans les articles « Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* after experimental PAH/PCB contamination » et « Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions » figurant à la suite de cette synthèse. Ce chapitre vise à synthétiser et confronter les résultats obtenus en protéomique et en approche ciblée.

Plan expérimental

- Modèle : flets juvéniles (0+) issus d'un élevage
- Contamination par un cocktail de HAP et PCB construit pour refléter les niveaux de contamination trouvés dans la Seine (C1) et 10 fois ces niveaux (C2). Afin de se rapprocher de conditions environnementales, la contamination est apportée par la nourriture (granulés commerciaux imbibés du cocktail polluant).
- Prélèvements après 15 jours d'acclimatation (T0), 14 puis 29 jours de contamination (T14 et T29), puis après 14 jours de décontamination (T43) (figure 1)

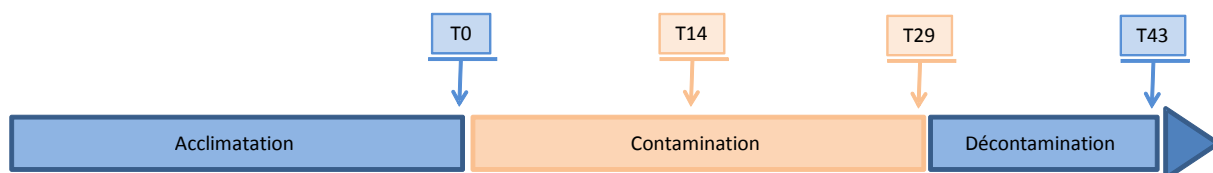


Figure 5 : Représentation schématique du plan expérimental.

- L'expérience a été réalisée en réplicats de bacs
- Echantillonnage
 - N=13
 - Prélèvement du foie, du muscle, prise de sang et congélation immédiate dans l'azote liquide
 - La carcasse est conservée pour les dosages chimiques
- Les paramètres physico chimiques ont été contrôlés tout au long de l'expérience :
 - Température comprise entre 14 et 17°C (figure 2)

- Salinité de ≈ 35 g/l environ (eau de la rade de Brest)
- Les contaminants ont été dosés dans les granules (PCB et HAP) et dans les carcasses des poissons a T29 (PCB). Les résultats (tableau 1, article 2) montrent un rapport d'environ 10 entre les doses C1 et C2 dans les granules comme dans les carcasses, ce qui indique que la voie de contamination était appropriée.

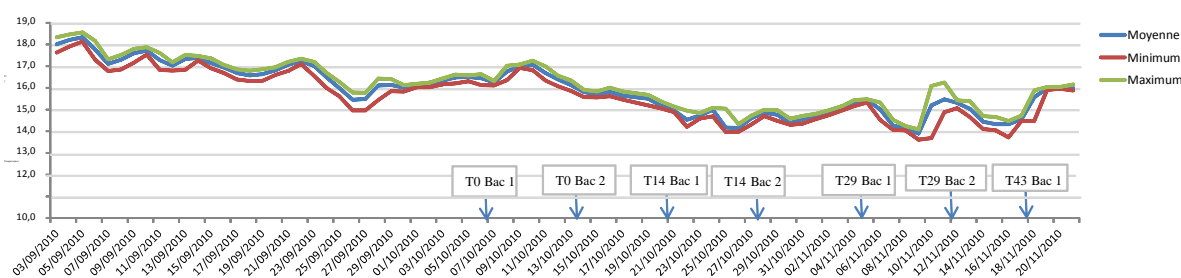


Figure 6 : Evolution de la température de l'eau au cours de l'expérimentation. Les flèches représentent les prélèvements après acclimatation (T0), après 14 et 29 jours de contamination (T14, T29) puis 14 jours de décontamination (T43) dans les bac 1 et 2.

- Paramètres biologiques mesurés :
 - Extraction dans du Tris-HCL pH=6.8 au Precellys (Bertin technology)
 - Précipitation des protéines au TCA/acétone
 - IEF sur bandelettes d'acrylamide, protant un gradient de pH 3-10 linéaire (13 cm)
 - SDS-page en gradient 10-15% en acrylamide
 - Analyse d'image et statistiques par le logiciel Progenesis Samespot (Nonlinear dynamics)
 - Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI TOF-TOF après digestion trypsique.
- Marqueurs du système immunitaire :
 - ✓ Le lysozyme est une enzyme impliquée dans la réponse innée et joue un rôle dans la protection antimicrobienne. Il joue un rôle dans la lyse des bactéries à gram positif et à gram négatif, et dans l'activation du système du complément

- ✓ Le complexe C3 joue un rôle pivot dans l'activation du complément, système impliquée dans la modulation de la phagocytose, de la lyse des cellules et la réponse inflammatoire
- ✓ Le système du TNF, impliquant le TNF et son récepteur TNF-R, sont impliqués dans les voies de signalisation cellulaires impliquant l'inflammation, l'apoptose, la nécrose et l'homéostasie des lymphocytes. Le TNF alpha pourrait aussi moduler les processus de biotransformation par une régulation négative de l'activité du CYP450.
- Marqueurs du métabolisme énergétique : la cytochrome C oxydase (CCO) est une enzyme terminale de la chaîne de respiration cellulaire (complexe IV) et constitue un proxy des capacités métaboliques de la cellule.
- Le test COMET permet de mesurer les dommages à l'ADN causés notamment par le stress oxydant
- Le CYP4501A est un complexe impliqué dans la détoxification notamment des composés organiques (HAP et PCB)
- La bétaine homocystéine methyl transférase (BHMT) est une enzyme impliquée dans la méthylation de l'homocystéine en méthionine. L'étude protéomique ayant montré une dérégulation de cette enzyme, son expression a également été mesurée par expression de gène.

Tableau 2 : Paramètres mesurés après contamination expérimentale de juvéniles de flets européens par un cocktail de HAP et PCB reflétant les concentrations trouvées dans la seine et 10 fois cette concentration.

	Expression de gène	protéomique	Activité enzymatique	Individu	Dommages cellulaires
	N=10	N=3	N=10	N=10	
organe	foie	foie	Sang/muscle		Erythrocytes (sang)
Système immunitaire	TNF-R, C3		Lysozyme		
Métabolisme énergétique			CCO	SGR, IC	
Stress oxydant		Approche globale et sans <i>a priori</i>			COMET
Détoxification	CYP4501A				
Métabolisme de la méthionine	BHMT				

Synthèse des résultats

- L'étude protéomique par électrophorèse en 2 dimensions a montré la dérégulation du métabolisme énergétique, et du métabolisme de la méthionine. Des enzymes de détoxification et de défense anti-oxydantes sont également accumulées à T29C2. Les besoins en glutathion de la cellule semblent ainsi être augmentés à la fois pour la détoxification des xénobiotiques par la GST et en tant que défense anti-oxydante (GPx). L'hypothèse de l'implication de la BHMT et de la SHMT dans un cycle aboutissant à la production de glutathion peut être formulée (figure 6, article 2).
- L'étude ciblée a montré :
 - Les profils d'induction de la BHMT et du CYP1A convergent notamment après 14 jours de décontamination. Ce résultat 1) suggère l'existence de liens entre l'induction de BHMT et les mécanismes de détoxification 2) montre la persistance de ces systèmes de détoxification après décontamination au niveau transcriptomique alors que l'effet n'est plus visible en protéomique.
 - Aucun effet n'a été observé sur le métabolisme énergétique au niveau de l'activité de la CCO et des indices de conditions alors que l'accumulation des protéines impliquées dans la glycolyse ou le cycle de Krebs semble dérégulée, de même que la β -globine.
 - Une modulation du système immunitaire : l'activité du lysozyme est diminuée alors que l'expression des gènes codant le C3 et le TNF-R sont augmentés. Ces résultats montrent que la contamination chimique peut avoir des effets opposés sur différentes composantes du système immunitaire et en fonction du niveau d'intégration considéré, ce qui souligne donc l'intérêt de l'utilisation de plusieurs tests simultanément afin d'avoir une vue d'ensemble. Au contraire aucune protéine impliquée dans le système immunitaire n'a été révélée comme dérégulée dans l'étude protéomique.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des résultats après contamination expérimentale de juvéniles de flets européens par un cocktail de HAP et PCB reflétant les concentrations trouvées dans la seine et 10 fois cette concentration. Les paramètres en bleu sont diminués, et les paramètres en orange sont augmentés sous l'effet de la contamination par rapport au contrôle pour un temps de prélèvement donné.

		T14		T29		T43	
		C1	C2	C1	C2	C1	C2
Système immunitaire	Lysozyme						
	C3						
	TNF-R						
Métabolisme énergétique	SGR, IC						
	CCO						
	ENO						
	NDPK, MDH (1 et 2), β -globin						
Stress oxydant	Dommages à l'ADN						
	CAT-1 et CAT-2						
	GPx						
	SOD						
Stress oxydant/détoxification	GST						
Détoxification	CYP1A						
Métabolisme de la méthionine	BHMT						
	BHMT						
	SHMT-1 et 2						
Réponse au stress	HSC70						

Conclusion et perspectives

Les études aux différents niveaux d'intégration apportent des résultats concordants mais les méthodes employées sont complémentaires. En effet, les dérégulations ne sont pas forcément trouvées sur les mêmes protéines. Plusieurs éléments peuvent expliquer cette observation :

- La régulation de l'activité de protéines peut s'effectuer à plusieurs niveaux : l'accumulation des protéines dépend du niveau de transcription des gènes comme de la dégradation des protéines. La régulation de l'activité peut aussi dépendre de la disponibilité en cofacteur, de modifications post-traductionnelles, ou de la présence d'agents agonistes ou antagonistes.

- L'électrophorèse en 2 dimensions présente des limites techniques qui ne permettent pas de détecter certaines protéines (protéines membranaires, par exemples).

Article 2 : Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to experimental PAH-PCB contamination.

Article en corrections mineures dans Marine Pollution Bulletin

Authors : Claire GALLAND ¹, Célie DUPUY ¹, Véronique LOIZEAU ², Morgane DANION ³, Michel AUFFRET ¹, Louis QUINIOU ¹, Jean LAROCHE ¹, and Vianney PICHEREAU ^{1,*}

¹*Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, LEMAR, UMR 6539 UBO/CNRS /IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France*

²*Unité de Biogéochimie et Ecotoxicologie, IFREMER, Centre de Brest, BP70, 29280 Plouzané, France*

³*ANSES, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation et de l'environnement et du travail, site de Ploufragan-Plouzané-Technopole Brest Iroise, 29280 Plouzané, France*

*** Correspondence**

Vianney PICHEREAU
*Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, LEMAR UMR 6539
CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer,
Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France
Tel: +33 2 98 49 86 12
Fax: +33 2 98 49 86 09
E-mail: vianney.pichereau@univ-brest.fr*

ABSTRACT

Platichthys flesus is often used as a sentinel species to monitor the estuarine water quality. In this study, we carried out an experimental contamination of fish using a PAHs/PCBs mixture. The PAHs/PCBs cocktail was designed to mimic the concentrations found in the Seine estuary (C1) and 10 times these concentrations (C2). We used a proteomic approach to understand the molecular mechanisms implied in the response of *P. flesus* to these xenobiotics. The data indicated that 54 proteins were differentially accumulated (p-value < 0.05) in one or several conditions. 34 of the corresponding protein spots displayed accumulation factors higher than 2. 18 of these proteins were identified by MALDI TOF-TOF mass spectrometry. The results indicated the deregulation of oxidative stress- and glutathione metabolism- (GST, GPx) proteins as well as the deregulation of several proteins belonging to the betaine demethylation pathway and the methionine cycle (BHMT, SHMT, SAHH). These results suggested that these different pathways interacted in response to *P. flesus* chemical contamination.

Keywords:

Platichthys flesus, proteomics, pollution, biomarker, betaine and methionine metabolism, persistent organic pollutants.

1. Introduction

Estuaries are connection zones between land and sea of high ecological importance (Able, 2005; Vasconcelos et al., 2011). Rivers receive and carry particles within the drainage basin in urban, industrial and intensive culture areas. Pollutants such as heavy metals and organic contaminants often accumulate in estuarine waters and sediments. This induce the degradation of the overall quality of the habitat of marine organisms (Courrat et al., 2009). Hydrophobic organic pollutants are often persistent in the environment. They can be fixed on organic materials, be ingested by organisms and tend to bioconcentrate and bioaccumulate in food webs (Loizeau et al., 2001). High predators such as carnivorous fish can be exposed to high concentrations of these contaminants.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) are produced by industrial and agricultural activities. Their adverse effects on organisms can include genotoxicity, embryotoxicity, carcinogenicity or immunotoxicity (Cachot et al., 2006). They also induce the production of detoxification enzymes, especially through the activation of the arylhydrocarbon receptor (AhR) (Blanchard et al., 1999; Wang et al., 2009). Response or damages biomarkers can be used to demonstrate the exposure of organisms to contaminants or its effects in environmental monitoring (van der Oost et al., 2003). In the last decade, -omics experimental strategies demonstrated their utility in ecotoxicology. This approach was used to study and to understand better the molecular mechanisms in fish response to xenobiotic exposure (Leaver et al., 2010; Williams et al., 2013, 2008). These tools are very promising to identify new molecular biomarkers. Because they play a role as effectors of cellular mechanisms, receptors, structure or signaling molecules, proteins are key molecules of the cell machinery and the organism physiology. Proteomic tools are global and without *a priori* approaches. Changes of abundances can be detected in some proteins under environmental pressure. The

identification of these proteins brings essential information on the actual physiology of organism under adverse conditions (Tomanek, 2011). A few proteomic studies were focused on PCBs and PAHs effects in fish. For example, Berg et al. (Berg et al., 2011) studied the brain proteome of the Atlantic cod *Gadus morhua* after PCB153 contamination. Sanchez et al. (Sanchez et al., 2009) studied the effects on the liver proteome of the largemouth bass (*Micropterus salmoides*) after acute and independent exposure to two PAHs (toxaphene, phenanthrene), a PCB (PCB126) and cadmium chloride. Most of the studies focus on the exposure of fish to a single contaminant rather than to mixtures. Contaminants are usually found in mixtures in the environment but the effects of chemical combinations are rarely addressed. Bohne-Kjersem et al. (Bohne-Kjersem et al., 2009) studied the plasma proteome of the Atlantic cod *Gadus morhua* after a crude oil contamination, containing a combination of PAHs. Costa et al. (Costa et al., 2010) studied the liver proteome response of soles *Solea senegalensis* after a subacute exposure to cadmium, benzo(a)pyrene or their combination. The authors demonstrated that the exposure to pollutants in mixture had a different effect on soles compared to independent pollutant exposure. It is well known that combining contaminants may cause synergistic or antagonist effects and that the effects of the combination can be different from the effects of each contaminant independently (Celander, 2011).

In this study, the European flounder *Platichthys flesus* was contaminated through food with a cocktail of contaminants designed to reflect the levels of PAHs and PCBs found in one of the most polluted estuaries in Europe: the Seine (Cachot et al., 2006; Motelay-Massei et al., 2004). The European flounder is a catadromous fish living in estuaries which are nurseries for this species (Dando, 2011). *P. flesus* is known to have a high capacity to adapt to changes of environments characterized by reduced salinity, hypoxia or highly variable temperatures (Evrard et al., 2010; Hemmer-Hansen et al., 2007; Laroche et

al., 2013; Larsen et al., 2007; Marchand et al., 2010). Juvenile flatfish feed on benthic organisms and live in close association with the bottom sediments where a large part of chemical pollutants accumulate. These fish are considered as particularly sensitive to pollution and other types of habitat degradation. For this reason, they are considered as a valuable sentinel species and often used to monitor estuarine water quality (Amara et al., 2009; Leaver et al., 2010; Lyons et al., 2010). Only few proteomics studies have been devoted to this species to date. The liver proteomic signatures have been characterized by 2-dimensional electrophoresis (2DE) in flounders living in estuaries presenting different contamination patterns in a previous study. This study demonstrated the potential of proteomic approaches in flounders in an environmental monitoring perspective (Galland et al., 2013). The aim of the present study is to elucidate the response mechanisms of fish after an experimental PAHs/PCBs contamination and to identify potential new biomarkers. To mimic environmental contamination conditions, *P. flesus* were contaminated through food by a cocktail of PAHs and PCBs designed to be similar to the concentrations found in the Seine and 10 times these concentrations. Proteins that accumulated in the contaminated fish liver, the main detoxification organ, are identified by 2DE.

2. Methods

2.1. Experimental design and procedure

Juveniles of *P. flesus* (cohort 0+) were purchased from a farm (Fishlab, Danemark) in October 2010. They were reared in our laboratory in experimental tanks. The water was directly collected from the Bay of Brest (salinity ≈ 35 g/l, temperature maintained between 14 and 17°C). After 14 days acclimation, thirteen fish were sacrificed (T0) and the remaining ones were separated in six groups: two control groups (control and control

+ solvent) and two contaminated groups in batch replicates (C1 and C2). Fish were contaminated through food with pellets soaked with a PAHs/PCBs mixture dissolved in iso-octane (Table 1). The PAHs/PCBs cocktail was designed to reflect the PAHs (Cachot et al., 2006) and PCBs (Abarnou and Duchemin, 2008) concentrations respectively found in sediments and fish from the heavily polluted Seine estuary (C1) and 10 fold these concentrations (C2). A mixture was prepared by the IDHESA laboratory. The quantities of contaminants loaded into the pellets were measured by IDHESA to check the efficiency of the impregnation (Table 1).

After 14 (t14) and 29 (t29) days of contamination, 13 fish were sacrificed per group. The remaining fish were fed with normal non-contaminated commercial pellets and ten fish per group were sacrificed after a 14-days recovery period (*i.e.* 43 days after t0).

One day before t0, animals were tagged and weighed. Their standard length (Lsd) was also determined by measuring fish from the mouth to the hypural joint (*i.e.* without taking into account the caudal fin). The Lsd and total- and gutted-carcass weights of each fish were measured when sacrificed. Fragments of liver were rapidly dissected and frozen in liquid nitrogen. The carcass of each fish was stored at -20°C until PCBs analysis. Samples were kept at -80°C until further analyses. Ten samples per condition and organ were kept for biomarkers analyses (Dupuy et al., 2014). Three livers per condition were kept for proteomic analyses by two-dimensional electrophoresis.

A visual inspection did not reveal any trace of liver pathology or parasite infection. All experiments were performed according to the guidelines laid down by the French "Ministère de l'Agriculture" and the European Union council directive for the care and use of laboratory animals.

Table 1: Concentration of chemical pollutants measured in the soaking solution, in pellets and in fish carcasses. Concentrations are given in ng/g of dried-weight. Concentrations were quantified in one representative sample in pellets and in carcasses of n non contaminated fishes at the end of the experiment. Results in fishes are given as mean±sd.

Measured concentrations of pollutants in ng/g		Control with iso-octane		C1		C2		Final concentration in carcasses of non contaminated fish (n=5)
		In pellets	In soaking solution	In pellets	In soaking solution	In pellets		
PAH	fluoranthene	2.3	210	189	2100	2072		nm
	pyrene	3.2	200	176	2000	1916		nm
	benzo(a)anthracene	0.7	70	49.6	700	640		nm
	chrysene	1.5	130	84.8	1300	1144		nm
	benzo(b)fluoranthene	2.3	170	116	1700	1501		nm
	benzo(k)fluoranthene	0.7	60	43.3	600	529		nm
	benzo(a)pyrene	1.3	60	42.1	600	517		nm
	indeno(1,2,3-cd)pyrene	nm	50	nm	500	514		nm
	benzo(ghi)perylene	0	50	54	500	435		nm
	Total sum HAP	12	1000	754.8	10000	9268		
PCB	CB 28	0	5	4.2	50	47.1		3.14±0.13
	CB 52	0.4	25	24.3	250	252		1.76±0.17
	CB 101	1.6	50	43.8	500	470		4.34 ±0.32
	CB 149	2.1	50	42.8	500	477		2.32±0.29
	CB 118	1.1	50	41.7	500	465		6.64±0.40
	CB 153	3.3	100	86	1000	939		2.06±0.41
	CB 105	1.4	25	20.3	250	238		1.62±0.10
	CB 138	2.6	100	79.4	1000	911		3.54±0.32
	CB 156	1.2	25	20.3	250	218		0.92±0.06
	CB 180	1.4	50	37.9	500	449		1.92±0.12
	CB 170	1.5	25	17.7	250	212		1.86±0.41
	CB 194	0	5	3.5	50	42.5		0.24±0.02
	CB 126	0	5	3.9	50	46.9		nm
	CB 31	nm	nm	nm	nm	nm		2.62±0.17
	CB 110	nm	nm	nm	nm	nm		1.94±0.13
	CB 132	nm	nm	nm	nm	nm		1.94±0.25
	CB 187	nm	nm	nm	nm	nm		1.02±0.12
	CB 128	nm	nm	nm	nm	nm		1.56±0.13
	Total sum PCB	16.6	515	425.8	5150	4767.5		39.44
Total sum PAH + PCB		28.6	1515	1180.6	15150	14035.5		

2.2. *Biometric indexes*

The body condition factor (CF) was calculated by using the formula: $CF = 100 \times W / Lsd^3$, where W is the gutted-carcass weight (g) and Lsd is standard length (mm) of each fish. The growth of each fish was estimated by measuring the specific growth rate (SGR) by the formula : $SGR (\%/day) = 100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t$, where W0 and Wt are the initial and final weights, respectively, and t is time (day) (Talbot, 2007).

2.3. *Food preparation and PCBs analyses in food and fish*

Commercial food (Inicio plus, 1.9 mm) was obtained from Biomar (France). It consisted of a formulated feed containing 61% crude protein and 33% crude fat. Spiked food was batch prepared to avoid deterioration. An iso-octane solution with known amounts of thirteen PCBs congeners and 9 PAHs (AccuStandard Inc., New Haven, USA, purity above 98%) was slowly added to food pellets in order to prepare diets. PCBs mixtures were composed of the seven indicator PCBs congeners (CB28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) and a few others to describe a larger range of chlorination from 3 to 8 chlorine atoms (CB105, 126 149, 156, 170, 194). PAHs mixtures were constituted of 9 high molecular weight PAHs (three to five rings) found in European and American estuaries. These molecules were previously used in several contamination studies using PAHs mixtures (Arkoosh et al., 2001; Bravo et al., 2011).

Two diets were prepared: PCBs&PAHs-medium (C1) and PCBs&PAHs-high (C2). The targeted concentrations of individual congeners are shown in Table 1. Only the PCBs concentrations were assayed to confirm fish contamination because PAHs are metabolized by fish. Batches of spiked food were stored in amber containers in a cool and dark place during their use (about 1.5 months). Individual PCB congener concentrations were

determined in each batch of spiked food (Table 1). Non-spiked food was also analyzed for PCB levels. Concentrations were estimated between < 0.05 ng/g dry weight (dw) and 3.0 ng/g dw (mean values calculated on 5 replicates) depending on the congener. In addition to the congeners used to contaminate the food, CB 31 (not detected; nd), CB 77 (nd), CB110 (0.75 ng/g dw), CB132 (nd), CB128 (nd), CB187 (nd) non-added congeners and p,p_DDE (3.50 ng/g dw) were measured.

PCB analyses in fish carcasses were performed according to the protocol described by Bodiguel et al. (2009). The freeze-dried fish carcass samples were spiked with recovery standards (CB30, CB198 and CB209) prior to extraction. Approximately one gram of sample was extracted in a hot Soxhlet extraction apparatus (Soxtec) over 1.5 h with a hexane:acetone mixture (80:20). The amount of extracted fat was determined by gravimetric analysis. Two successive cleanups were performed on the extractable material. Lipids and co-extractable materials were destroyed by adding concentrated sulphuric acid. The cleaned extract was purified by adsorption chromatography on a Florisil column (16% MgO + 84% SiO₂, activated for 1.5 h at 500°C, deactivated with 3% of demineralised water) and eluted with pentane. PCB congeners were analyzed by gas chromatography with an electron capture detector on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 capillary column (60 m length, internal diameter 0.25 mm and 0.15 µm phase film thickness) following optimized conditions described by Jaouen-Madoulet et al. (2000). The system was calibrated within quite a large range using a six-point calibration curve to define the linearity range of our detector (ECD) for all contaminants. During analysis of the real experimental samples, analytical blanks were systematically measured every ten samples. The blank concentrations were always lower than the concentrations of the lowest standards of all congeners. Replicates of homogeneous tissue preparation of fish muscle (n =5) samples were analysed to evaluate the method accuracy in terms of

repeatability. Resulting relative standard deviation (RSD) was less than 10% for all congeners. Surrogate recoveries were $101 \pm 14\%$ for CB30 and $91 \pm 16\%$ for CB198 and CB209 (mean \pm SD calculated on $n = 15$ analyses). No surrogate correction was done for the reported concentrations. Certified reference material (NIST-SRM1588b from the National Institute of Standards and Technology, USA) was routinely included in each sequence of samples and the results were in the range of certified values. SRM1588b consists of cod liver oil sample for which certified values are given for 27 congeners at concentrations of between $3.2 \pm 0.26 \text{ ng.g}^{-1}$ and $275 \pm 4 \text{ ng.g}^{-1}$ dw. Recoveries were between 74 and 125 % depending on the congener. The laboratory regularly takes part in Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe (QUASIMEME) intercomparison exercises for PCBs in biota. The obtained Z-scores are satisfactory *i.e.* between -2 and +2.

2.4. Proteomic analysis

Protein extraction. Proteomic analyses were conducted as described in Galland *et al.* (2013). Briefly, frozen fish livers were homogenized in 1 mL of Tris-HCl buffer (100 mM, pH 6.8) containing 1% Protease Inhibitor Mix (GE Healthcare) using a Precellys 24 system (Bertin Technologies). The supernatants were removed by centrifugation (12 000 g, 15 min, 4°C) and incubated at room temperature for 30 min with 1% DNase mix (GE Healthcare). Total protein contents were determined using a DC protein assay kit (biorad) in triplicate.

The volume corresponding to 500 μg of proteins was concentrated by TCA (10%, v/v) precipitation. Proteins were harvested by centrifugation (12 000 g, 10 min, 4°C) and the protein pellet was washed several times until neutralization using a mix Tris-HCl (50 mM, pH 8) - acetone (20/80:vol/vol) containing traces of bromophenol blue (used as a pH indicator). Supernatants were discarded and protein pellets were dried in the air and

resuspended in 250 μ L of Destreak Rehydration Solution (GE Healthcare) containing 1% IPG buffer pH 3-10 (GE Healthcare).

Two-Dimensional Electrophoresis (2-DE) analysis. Protein extracts were individually loaded on linear pH 3-10 gradient IPG strips (13 cm, GE Healthcare). Isoelectrofocusing was performed in an Ettan IPGphor III isoelectric focusing system (GE Healthcare). The following protocol was used: a 15-min step at 250 V, a 2-h step 500 V, a 1-h gradient to 1 000 V, a 2.5-h gradient to 8 000 V, and a final 1.5-h step at 8 000 V.

After the first dimension, the strips were equilibrated 15 min in an equilibration solution (2% SDS, 6 M Urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 30% glycerol (v/v), BBP) containing DTT (1%). They were equilibrated for another 15 min in an equilibration solution containing iodoacetamide (260 mM). The second dimension was performed in 10-15% gradient polyacrylamide gel, as described in Budin-Verneuil et al. (2007). Proteins were revealed by incubating gels in 0.1% Coomassie blue staining solution (PhastGel Blue R-350 GE Healthcare) overnight. Gels subsequently were washed in a methanol - acetic acid - water (30/7/63 : v/v/v) solution.

Electrophoregrams analyses. Image analyses were carried out on three 2-DE gels per condition. Gels were scanned. Image and statistical analyses were performed using the Progenesis SameSpot software (Nonlinear Dynamics). The relative intensities were determined for each spot by integrating its color intensity and area and normalized against the background. Relative intensities for each spots were compared after gel comparison and spot matching. Spots displaying ANOVA p-values below 0.05 (as given by Progenesis SameSpot) were considered as significant and were selected for protein identification.

Mass spectrometric analysis. Selected spots were manually excised from 2-DE gels. Proteins were in-gel trypsinized. Briefly, the gel pieces were washed in 50 mM ammonium bicarbonate (BICAM). They were dehydrated in 100 % acetonitrile (ACN). Gel pieces were vacuum dried, rehydrated with BICAM containing 0.5 µg trypsin (Promega) and incubated overnight at 37°C. Peptides were extracted from the gels by alternative washing with 50 mM BICAM and ACN and with 5% formic acid and ACN. Between each step, the supernatants were pooled and concentrated by evaporation using a speed vac (45°C). Samples were resuspended in TFA (0.1% in water). Peptides solutions were mixed with α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA, 10 mg/ml of a ACN/TFA/water (60/4/36: v/v/v) solution) and spotted on a polished steel MALDI target using the dried droplet method. Peptides were analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight tandem mass spectrometry (MALDI TOF-TOF) in positive ion reflector mode, using an Autoflex III (Bruker Daltonics) mass spectrometer with the parameters described by Artigaud et al. (2014).

Proteins identification. Mass spectrometric data were analyzed using both Mascot online (Matrix Science Ltd.) and the Peaks software (Bioinformatics Solutions) for MS/MS-based identification and *de novo* sequencing. The search parameters allowed for one trypsin miscleavage, oxidation of methionine, carbamidomethylation of cysteine and at least 100 ppm mass accuracy. False discovery rates were also estimated using a reverse database as decoy. Four different databases were used: a NR protein database, and 3 ESTs databases which contained the sequenced ESTs of vertebrates, of fish or a one that contained only the *Platichthys* ESTs sequenced to date. The highest correlation was obtained with the vertebrate ESTs database using the Peaks software. All sequence tags obtained were subjected to homology searches using the Blast algorithm available at www.ncbi.nlm.nih.gov.

3. Results

3.1. Body condition and chemical analyses

P. flesus were acclimated to our Laboratory conditions during 13 days. They were subsequently exposed to chemical contamination by feeding them with pellets soaked in a PAHs/PCBs mixture with 2 different concentrations. The composition of the PAHs/PCBs cocktail composition was designed to be similar to the PAHs/PCBs concentrations found in the Seine (C1) or ten times higher (C2) (Table 1). Two control experiments (no contamination) were carried out: fish were fed with normal pellets (control) or with pellets soaked with solvent (solvent control).

After 29 days exposure, the PCBs concentrations in fish carcasses were quantified. The results indicated that all of these fish accumulated PCBs (Figure 1). It was also observed that fish fed with the higher concentration (C2) accumulated approximately 10 times more PCBs than fish contaminated with C1. For instance, after 29 days of exposure, CB153 concentrations in fish carcasses were found to be 2.1 (+/- 0.6) ng/g DW in control fish after 29 days but reached 55.8 (+/- 10) and 609 (+/- 99) ng/g DW in fish exposed to C1 and C2, respectively (Fig. 1). These concentrations were similar to concentrations measured in the soaked pellets (Table 1). This demonstrated that this contamination method was appropriate and efficient. It was also noticed that PCBs levels did not return to normal values 14 days after the end of the contamination experiment. This suggested that this depuration period was too short to achieve a complete depuration process.

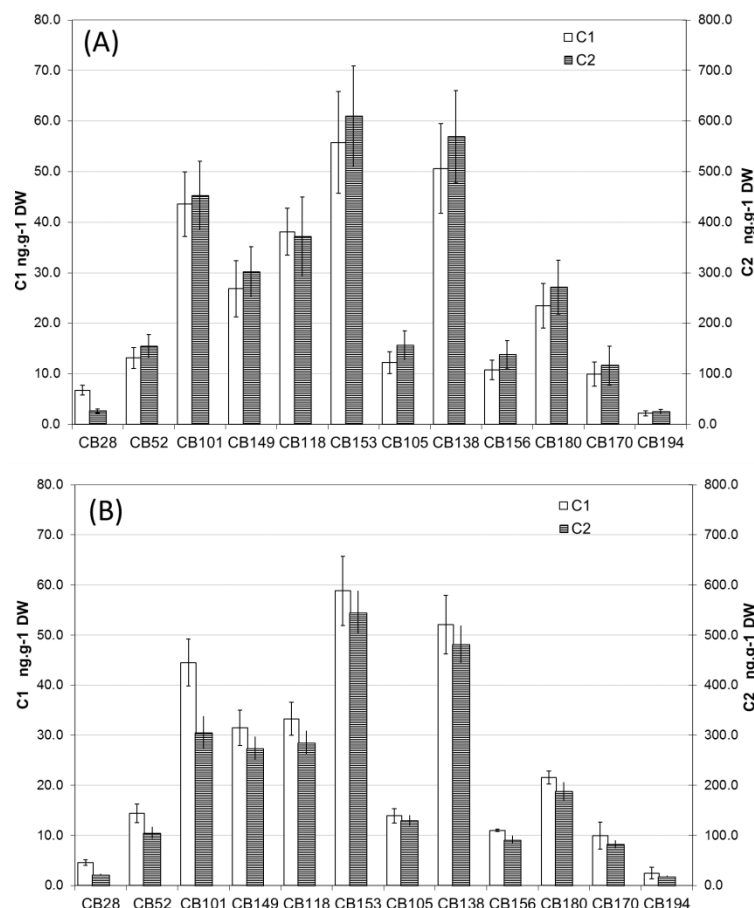


Figure 1. Measured concentrations of PCBs indicators in fish carcasses after: (A) 29 days of contamination and; (B) 43 days of experimentation (29 days of contamination and 14 days of recovery).

The body condition indexes (BCIs) and growth rates of fish were determined for each sampling time (Fig. 1A and 1B). No significant change of these parameters was observed during the experiment. This suggested that all the flounders ingested similar amounts of pellets the extent of the chemical contamination.

3.2. Two-dimensional electrophoresis

At each sampling time, the livers of three fish per condition were frozen in liquid nitrogen. Proteins were extracted and separated by 2-DE. After Coomassie blue staining, an average of 660 spots were detected on each gel (Fig. 3). Comparisons were carried out in order to

detect spots which displayed a significantly altered abundance in one or several conditions

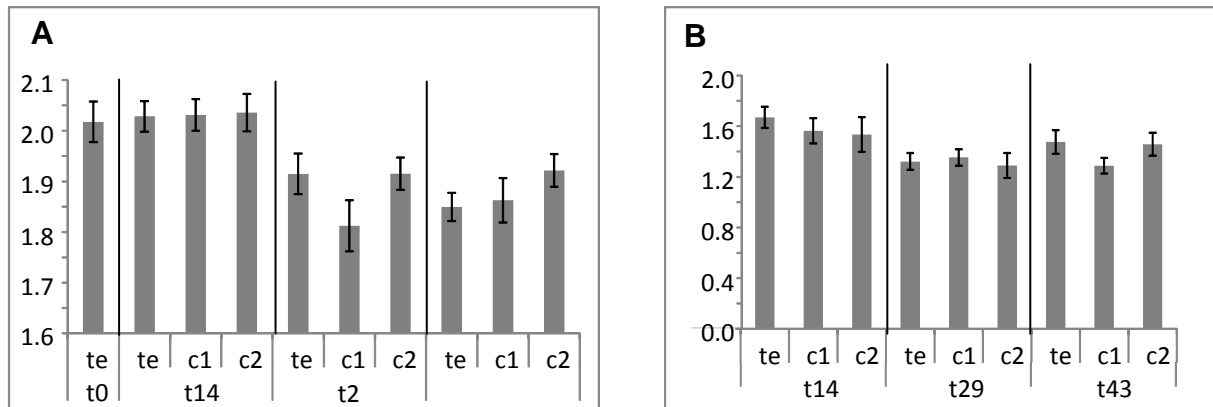


Figure 2: Morphometric measurements before sacrifice. A) Condition index B) Standard growth rate are given in mean±sd. No difference appears between animals at each sampling time (t0: before contamination, T14 and T29 after 14 and 29 days contamination T43, after 14 days of recovery), according to the treatment (Te, control; C1, C2 = 10 times C1)

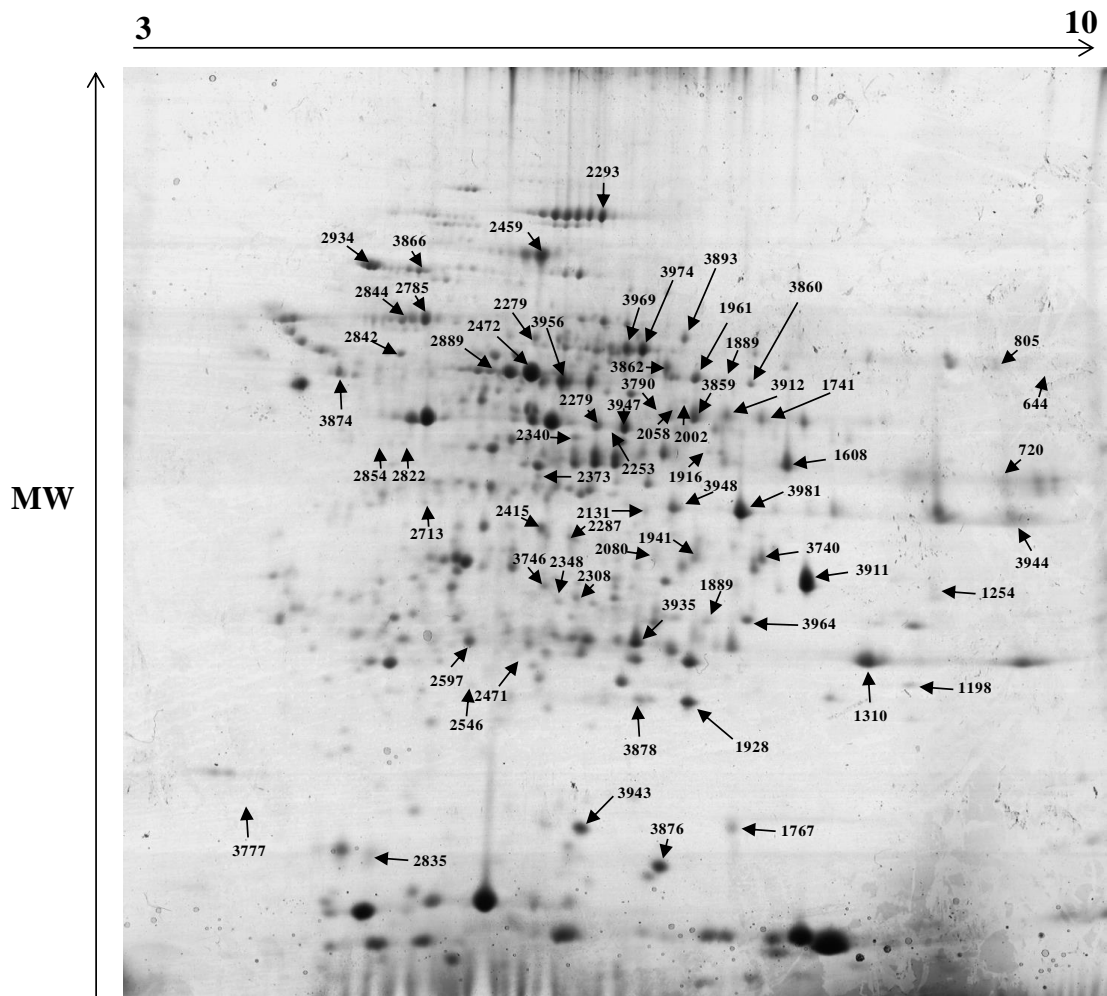


Figure 3: Master gel representative of protein profiles in livers of fishes after 29 days contamination with C2 concentration (T29C2). Numbers and arrows represent spots deregulated in at least one condition.

Table 2: Significant changes in proteins abundances during pollutants exposure

Spot number	Fold change	Change Profile Category ¹	p-value
<u>T29 C1 vs control</u>			
2348	2.1	IC1	0.002
1254	2.4	IC1	0.006
3745	1.7	IC1	0.008
2546	2.2	RC1	0.010
2854	1.6	RC1. RDC1	0.010
2279	1.6	IC1	0.015
2822	1.9	RC1. RDC1. RC2T15	0.024
3893	1.6	IC1.IC2	0.028
3969	1.6	IC1. IDC2	0.031
2471	2.3	IC1	0.033
1198	2.0	IC1. IC2	0.037
2842	1.6	IC1	0.041
2597	1.5	IC1	0.045
3974	1.5	IC1	0.048
2373	1.4	RC1	0.050
<u>T14 C2 vs control</u>			
2822	2.8	RC1. RDC1. RC2T15	0.007
644	2.2	IDC2. RC2T15. RC2	0.011
2287	1.8	RC2T15	0.021
2308	2.1	RC2T15	0.021
2472	1.3	RC2T15. RC2	0.023
2293	1.8	IC2T15	0.025
2934	1.3	RC2T15. RC2	0.041
2459	1.4	RC2T15	0.045
<u>T29 C2 vs control</u>			
1916	2.0	IC2. IDC1	0.001
1198	1.9	IC1. IC2	0.001
3860	2.8	IC2	0.001
1899	1.7	IC2	0.002
3893	2.1	IC1. IC2	0.002
3862	2.0	IC2	0.004
644	2.1	RC2T15. RC2. IDC2	0.005
3859	1.8	IC2	0.005
2058	1.9	IC2	0.005
3912	2.7	IC2	0.005
2934	1.4	RC2T15. RC2	0.006
1928	3.3	IC2	0.007
1961	2.3	IC2	0.007
3746	1.7	IC2	0.008

Spot number	Fold change	Change Profile Category ¹	p-value
2472	1.3	RC2T15. RC2	0.008
3790	1.8	IC2	0.012
3911	5.3	IC2	0.022
1741	2.0	IC2	0.023
1767	1.8	IC2	0.023
3981	1.7	IC2	0.024
1889	1.5	IC2	0.026
1310	2.1	IC2	0.027
1608	2.1	IC2	0.027
3740	2.1	IC2	0.030
1941	2.0	IC2. IDC1	0.033
3935	1.6	IC2. IDC2	0.033
2415	1.8	IC2	0.036
2589	1.6	RC2	0.037
3878	1.6	IC2	0.050

T43 vs control

3866	7.1	RDC1	0.001
644	4.9	IDC2. RC2T15. RC2	0.001
1916	3.6	IC2. IDC1	0.002
2844	2.2	RDC1. RDC2	0.011
2080	2.1	IDC1. IC2	0.012
2253	3.7	RDC1. RDC2	0.014
720	2.5	IDC1. IDC2	0.014
805	3.8	IDC2	0.019
2131	3.4	IDC1	0.020
2854	1.8	RC1. RDC1	0.027
2002	2.5	IDC2	0.028
2822	2.3	RC1. RDC1. RC2T15	0.028
3935	1.9	IC2. IDC2	0.034
3969	2.3	IC1. IDC2	0.050

¹IC1 and IC2 refer to spots which abundance was found increased, and RC1 and RC2 to those showing decreased intensities in T29 gels. For spots observed on T14 gels, the suffix T14 was added to IC2 or RC2. IDC1, IDC2, RDC1 and RDC2 refer to spots which intensities were found increased (I) or decreased (R) at T43.

The proteomic profiles of non-contaminated fish (control groups) were compared. No significant difference between controls with or without solvent was detected. Control pellets were only soaked with the solvent, iso-octane, a compound frequently found in petroleum. Safety datasheets of this compound indicate that its volatilization half-life in a model 1-meter deep river has been estimated at 3.1 hours. This suggested that in these experimental conditions, iso-octane volatilized during pellets drying. Fish (both from solvent control and C1 and C2 experiments) may not have been exposed to it. The proteomes obtained in the control group were also compared at the different sampling times. The relative intensities of five spots were lower at T0 compared to T14, T29 and T43. Four of these spots (*i.e.*, 2495, 2361, 2292 and 2335) may correspond to different protein isoforms of the Heat Shock Cognate HSC70 (see the identification section). No significant difference was observed between the T14-, T29- and T43- proteome profiles.

The proteomes profiles of chemically contaminated fish and control ones were compared to each other. The data indicated that the relative intensities of 54 spots were significantly different in one or several conditions with fold change values ranging from 1.3 to 7.1 (Table 2). For thirty four of them, the relative intensity was more than doubled in contaminated fish liver (fold change > 2). After 29 days of contamination with the concentration C1, the relative intensity of 11 protein spots was greater while the intensity of 4 others were lower. With the C2 concentration, the intensity of 7 spots out of 8 was lower after 14 days of exposure. Most of the modifications were observed in fish contaminated with the C2 concentration after 29 days exposure. The intensity of 25 out of 29 modified spots was increased. The intensities of only 6 spots were different in 2 different conditions from all the others: The spots 644, 2472 and 2934 in T14C2 and T29C2, the spots 1198 and 3893 in T29C1 and T29C2, and the spot 2822 in T14C2 and

T29C1 (Fig. 3). However, no protein was significantly deregulated in the different contamination conditions compared to control at all of the sampling times.

After the 29-days contamination period, fish were depurated. They were fed with normal commercial pollutant-free food for 14 additional days. The modifications of proteomes during this period were also examined. Relative intensities of 14 protein spots appeared significantly different. As shown in Table 2, the intensity of half of these protein spots (7) was modified in at least one of the other conditions tested during the contamination protocol. Seven spots were only detected in depuration conditions.

3.3. Proteins identification

A total of 48 protein spots were excised from gels, trypsinized and analyzed by MALDI-TOF-TOF tandem mass spectrometry. Mass spectra were compared to two custom databases, *i.e.* a fish ESTs- and a *P. flesus* ESTs- databases with the PEAKS software. Eighteen proteins were identified (Table 3). This corresponded to an identification ratio of 37.5%. This value was similar to the identification ratio usually described for this kind of non-model species (Dowd, 2012; Forné et al., 2010) and was higher than the one obtained for *P. flesus* (Galland et al., 2013). Proteins, such as the catalase, the Serine HydroxyMethyl Transferase (SHMT) or the malate dehydrogenase (MDH) were identified several times in different spots. These spots may correspond to different isoforms or to post-translationally modified forms of a single protein.

Three of these proteins may be linked to a part of the metabolism of methionine, *i.e.* the betaine homocysteine methyl transferase (BHMT, spot 3912), and two SHMTs (noted SHMT1 and SHMT2, corresponding to spots 3860 and 1961, respectively). Four others proteins may be related to oxidative metabolism, *i.e.* two catalases (noted CAT1 and

CAT2, corresponding to spots 3969 and 3974, respectively), the glutathione peroxidase (GPx, spot 1928) and the glutathione-S-transferase (GST, spot 3935). Three are implicated into the energetic metabolism such as an enolase (ENO, spot 2472), a nucleotide diphosphate kinase (NDPK, spot 3859) and two malate dehydrogenases (MDH1 and MDH2, spots 3981 and 2131). The Heat Shock Cognate 70 kDa (HSC70, spot 2293) and the beta-globin (BG, spot 3911) were also identified. Enolase was the only down-accumulated protein in fish exposed to the higher concentration of the PAHs/PCBs mixture (C2). All of the other identified proteins were up-regulated in at least one condition. In fish exposed to C2, some proteins such as NDPK, beta globin, MDH, SHMT1, SHMT2, BHMT, GPx and GST accumulated after 29 days. GST was still up-regulated after the 14-days recovery period. The two identified catalases were found significantly deregulated in fish exposed to C1.

HSC70 was the only protein identified in T14C2 samples. This protein was attributed to a spot included in a stretch of 6 spots displaying the same molecular weights and regularly disposed on the same horizontal line on the gel. These spots may be related to different phosphorylation states of the protein. Several of these spots (*i.e.* 2293, 2335, 2361 and 2495) displayed a lower relative intensity in T0 samples.

Tableau 3: Identification of differentially accumulated proteins¹

Spot n°	Identification	Short name	Species	NCBI accession n°	Sequenced peptides	Coverage (%)	PEAKS Score (%)
3860	Serine hydroxymethyltransferase	SHMT1	<i>Platichthys flesus</i>	gi 78227067	VNPETGYIDYDR YYGGTEHVDELER YSEGYPGQR FGSPALTSR	15.36	87.1
1928	Glutathione peroxidase	GPX1	<i>Platichthys flesus</i>	gi 78227841	DYTQMNELHQR DYTQM(+15)NELHQR LPFPTDEPTALLNDPR	11.46	41.9
1961	SHMT	SHMT1	<i>Sparus aurata</i>	gi 207959479	YSEGYPGQR YYGGTEHVDELER VNPETGYIDYDR	15.45	67.2
3911	Beta 2-globin	HBB	<i>Platichthys flesus</i>	gi 260099289	FLSVVVSALGR IDVGEIGPQALTR GVYSALSTM(15)HSEK HFSTFGDSTTAAILGSEK	42.97	98.8
3964	phosphoglycerate mutase 1a	PGAM1	<i>Ictalurus punctatus</i>	gi 56171915	VLIAAHGNSLR ALPFWNDEIAPQIK NLKPVKPMQFLGDEETVR NLKPVKPM(15)QFLGDEETVR	38.05	95.9
3859	nucleoside diphosphate kinase B	NME2	<i>Platichthys flesus</i>	gi 84117756	DTPFYAGLC(57)K FIQASEDHMK TFIAVKPDGVQR MMLGETNPADSKPGSIR M(15)MLGETNPADSKPGSIR YMSSGPVFAMVWEGQSIVK YM(15)SSGPVFAMVWEGQSIVK	43.50	98.9
2131	malate dehydrogenase	MDH1	<i>Lates calcefer</i>	gi 164358710	GDFISTVQLR VVDGLSINDFSR MDATAAELVEER	22.08	97.9
3981	malate dehydrogenase 1	MDH1	<i>Danio rerio</i>	gi 102905885	VVDGLSINDFSR	23.68	60.8
2293	Heat shock cognate 70 kDa	HSPA8	<i>Salmo salar</i>	gi 223570517	AQVHDIVLVGGSTR TVNNAVVTVPAYFNDSQR FEELNADLFR STAGDTHLGGEDFDNR GETKSFYPEIISSMVLVK TTPSYVAFTDSER AVGIPFQFK VELAAGQQYSEDFGK	26.33	98.8
3935	glutathione S-transferase theta 1b	GSTT1	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	gi 90600775	AVGIPFQFK VELAAGQQYSEDFGK	9.16	82.5

Spot n°	Identification	Short name	Species	NCBI accession n°	Sequenced peptides	Coverage (%)	PEAKS Score (%)
3874	ATP synthase beta-subunit	ATP5B	<i>Ictalurus punctatus</i>	gi 204214387	GQKVLDTGAPIR IMNVIGEPIDER AHGGYSVFAGVGER VALVYQGMNEPPGAR VALVYQGM(15)NEPPGAR LVLEVAQHLGESTVR AIAELGIYPAVDPLDSTSR	28.45	98.7
3956	Adenosylhomocysteinase B (SAHHb)	AHCY	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	gi 402742735	HIIVLAEGR INIKPQVDR	16.82	77.1
3974	catalase	CAT	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	gi 52354832	AVHPDYGNR TFYTQVLNEEER LFSYPDTHR LGANYLQIPVNC(57)PFR GAGAFGYLEVTHDITR	8.54	98.2
3969	Catalase	CAT	<i>Xiphophorus maculatus</i>	gi 192821533	AVHPDYGNR LFSYPDTHR LGANYLQIPVNC(57)PFR (GAGAFGYLEVTHDITR	12.25	97.3
3948	MDH	MDH1	<i>Gobiocypris rarus</i>	gi 120438805	VFGVTTLDIVR DDLNTNATIVATLADAC(57)AR	14.72	68.2
3944	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	GAPDH	<i>Oreochromis niloticus</i>	gi 253934731	VPTPNSVVDLTVR (LVSWYDNEFAYSQR	13.29	60.8
3943	copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD)	SOD1	<i>Platichthys flesus</i>	gi 78230468	NHAGPTDADR GAGETSGTVHFEQESDSAPVK	20.17	79.7
3912	Betaine homocysteine methyl transferase (BHMT)	BHMT	<i>Platichthys flesus</i>	CF379280	AGPWTPEATVTTHPEAVR	17	35*

¹Proteins were excised from 2-DE gels, trypsinolyzed, and the resulting peptides were sequenced by using MALDI TOF-TOF mass spectrometry. Spectra analysis was performed using the PEAKS Software. The score and the coverage ARE those given by the PEAKS software, using the search parameters described in the Materials and methods section. * BHMT was identified with MASCOT software and the score given is the MASCOT score.

3.4. Network analysis

In order to assess the functional relationships between the proteins identified in this study, the STRING 9.1 interface available at <http://stringdb.org> was used (Franceschini et al., 2013). This database of known and predicted protein interactions includes both direct (physical) and indirect (functional) associations. This database is more complete for model organisms than for non-model species such as *P. flesus*. The analysis was carried out using the interactions known in *Danio rerio* (Fig. 4A) and human (Fig. 4B). The results indicated a strong association between the proteins identified in this study. Two major clusters were observed. The first one included CAT, SOD1, and GPX1 as the major nodes. It might indicate that the metabolism of hydrogen peroxyde was the major GO biological process in this network (with a p-value of $7.9 \cdot 10^{-5}$ for the human homologs). The second cluster included SHMT, BHMT and AHCY. This suggested a major role of the glycine, serine, threonine and methionine metabolism.

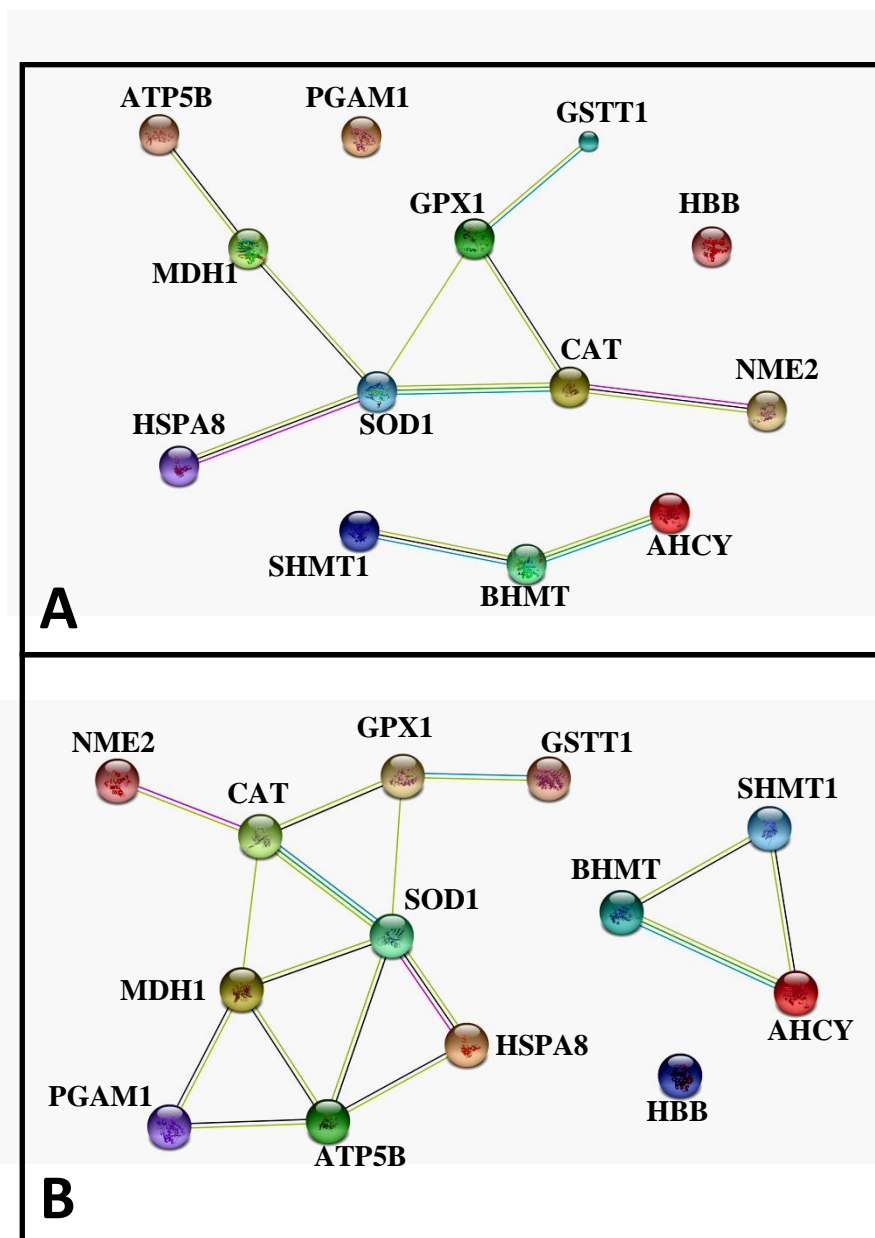


Figure 4. Network analysis of the proteins identified in this study. This network was built using STRING v. 9.1 (Franceschini et al., 2013), according to the knowledge of interactions between proteins in the model organisms *Danio rerio* (A) and human (B).

4. Discussion

Global approaches such as proteomics or transcriptomics are very efficient to identify new molecular determinants of a given response. Several transcriptomic studies were carried out in the European flounder to identify the deregulated genes in response to diverse

xenobiotics (Leaver et al., 2010; Williams et al., 2013, 2008). To the best of our knowledge, only one proteomic study was published in this species (Galland et al., 2013). Proteomic studies are more representative to the physiological functioning of organisms submitted to stress (Tomanek, 2011). In this paper, fish liver proteomic profiles were compared after 14 or 29 days of experimental contamination by a PAHs/PCBs cocktail and after 13 additional depuration days. 18 proteins were identified out of 54 spots presenting a significantly different relative intensity. Network analysis of this dataset strongly suggested a role for oxidative stress proteins and of the methionine metabolism in response of fish to this contamination.

In this study, network analyses identified CAT, SOD1, and GPX1 as the major nodes. These three proteins play a role in enzymatic protection against oxidative stress. Physiological processes such as respiration lead to the generation of reactive oxygen species such as hydrogen peroxide. Oxidative stress is defined as a loss of balance between the reactive oxygen species production and cellular anti-oxidant mechanisms such as the production of anti-oxidant enzymes. In this study, two catalases were significantly accumulated in fish after 14 days of exposure. This protein catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen. In addition, Glutathione peroxidase (GPx) was significantly accumulated in C2 treated fish livers. This protein catalyzes the oxidation of glutathione by hydrogen peroxide to glutathione disulfide (GS-SG). Glutathione is considered as one of the most important antioxidant in living cells. CAT, SOD and GPx could be part of the enzymatic response to underwent oxidative stress. Their accumulation in contaminated fish livers may be due to an increase of reactive oxygen specie production after xenobiotic exposure. Dupuy and coworkers used a COMET assay to measure DNA damages in experimentally contaminated European

flounders (Dupuy et al, 2014). They used the same contamination protocol as the one used in the present study. Results indicated a significant increase in median Tail intensity and in DNA damages in C2T29 fish. They also suggested that reactive oxygen species production may not completely be compensated by the enzymatic antioxidant response and may be a cause of damages, at least at the DNA level. Intracellular accumulation of reactive oxygen species such as superoxide, hydrogen peroxide or free radicals after exposure to xenobiotics is often described (Winston et al., 1996). This accumulation is attributed to a loss of balance between oxidant generation and antioxidant processes including protective enzymes (*e.g.* CAT and SOD), their substrate (*e.g.* glutathione) and repair of oxidative damages.

Glutathione is also a key molecule involved into phase II xenobiotic detoxification processes *via* conjugation reactions using broad-specificity glutathione S-transferases (GSTs). These enzymes are commonly induced at both the gene - and protein- levels in organisms exposed to pollutants and are commonly used as biomarkers (Nair and Choi, 2011; Napierska et al., 2006). In this study, the accumulation of GST in fish livers exposed to the higher PCBs/PAHs concentration (C2) was also observed. In comparison, the deregulation of another protein involved in detoxification processes, the cytochrome P-450, was unexpectedly not observed. Cytochrome P-450 catalyzes the oxidation of a broad range of xenobiotics. It is widely used as a biomarker. Dupuy et. al (2014) measured CYP4501A gene expression in *P. flesus* under the same experimental contamination conditions. A high induction in T29C2 condition was noticed. Classical 2-DE based proteomic protocols for proteins extraction and solubilization are usually optimized for soluble proteins and not for hydrophobic proteins. For this reason, CYP4501A, a hydrophobic membrane protein, was not detected in 2-DE analyses.

The induction of GST and GPx highlighted the major role of glutathione in the metabolism of fish exposed to the PAHs and PCBs mixture. Glutathione is an enzymatically assembled tripeptide, *i.e.* γ -glutamyl-cysteinyl-glycine. This suggested that the availability of its precursors may influence its synthesis.

In this study, three proteins highly accumulated in the livers of C2-exposed fish (accumulation factors from 2.3 to 2.8) were identified as BHMT and two SHMTs. The second cluster identified in the network analysis included SHMT, BHMT and AHCY. This suggested a major role of the glycine, serine, threonine and methionine metabolism. BHMT and SHMT are both involved into the demethylation pathway of glycine betaine leading to the production of glycine and serine, two precursors of glutathione (fig. 5).

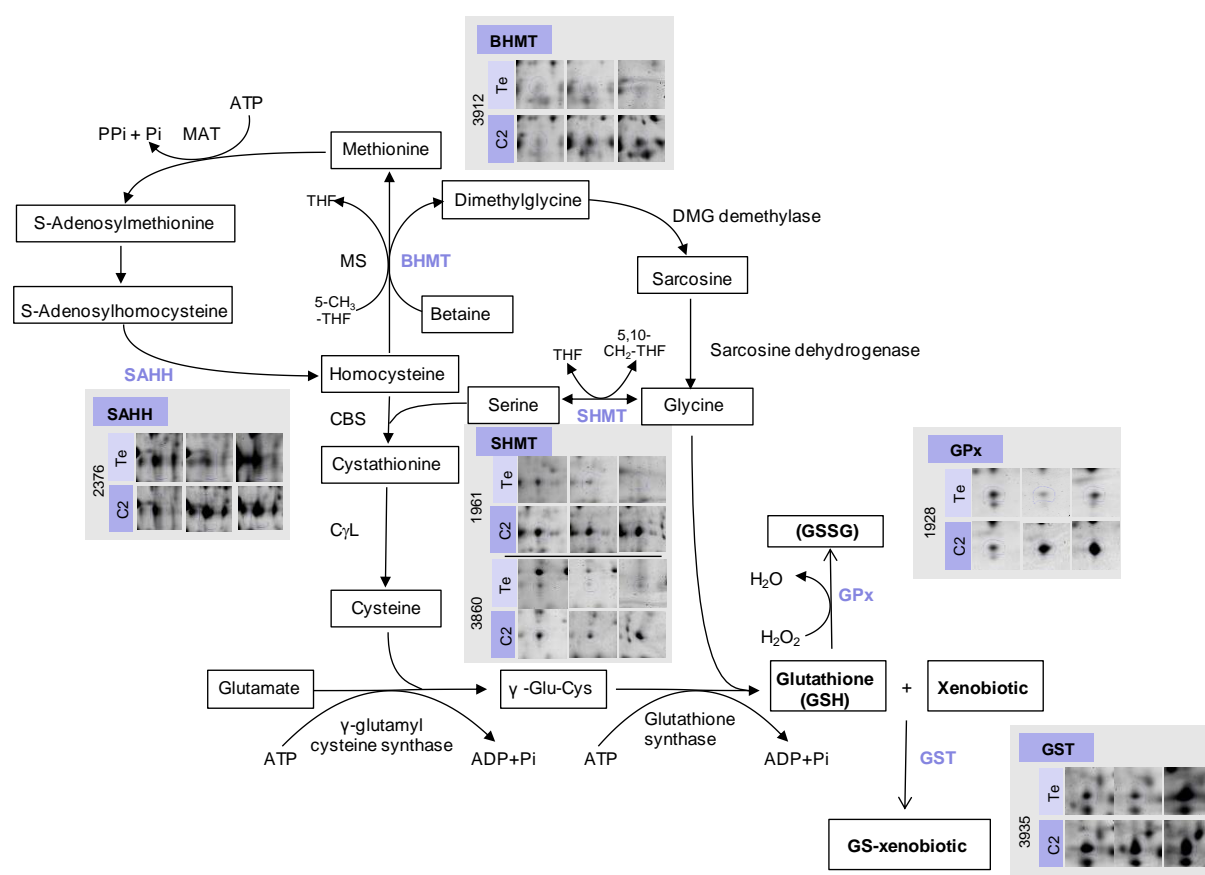


Figure 5: Hypothetic cycle implying BHMT, SHMT, SAHH, GST and GPx. For each identified protein, images of the spots are shown in T29Te vs T29C2 condition. CBS, cystathionine beta synthase; C γ L, cystathionine gamma lyase; MS, methionine synthase; BHMT, betaine homocysteine methyltransferase; SHMT, serine hydroxymethyltransferase; GST, glutathione S transferase; GPx, glutathione peroxidase

BHMT is also involved into the methionine cycle, a metabolism in which methionine is converted to S-adenosylmethionine (SAM). SAM is used as the methylating agent in many cellular methylation reactions (catalyzed by methyltransferases) such as: the synthesis of epinephrine, creatine, phosphatidyl choline or in the methylation of nucleic acids (ADN, ARN) and proteins. SAM produced during these methylation reactions is hydrolyzed to adenosine and homocysteine. They can subsequently be remethylated to methionine by either methionine synthase or BHMT which plays a key role in the modulation of this metabolism (fig. 5) (Ueland et al., 2005). Methionine metabolism is also involved in many methylation processes. Impacts of xenobiotic exposure on methylation processes and especially on epigenetic DNA methylation are more and more acknowledged in recent years (Oliva et al., 2009; Vandegheuchte and Janssen, 2011).

The methionine cycle also provides skeletons for the biosynthesis of other molecules. For instance, homocysteine sits as a metabolic crossroad: it can either be remethylated to methionine or catabolized into cysteine (fig. 5). This pathway also provides precursors of glutathione synthesis such as glycine and cysteine. In this study, the accumulation of GST and GPx, two enzymes using glutathione as substrate, was observed. The deregulation of the methionine cycle and betaine demethylation pathway, *i.e.* the accumulation of BHMT, may respond to the increased need in glutathione. Other ecotoxicological studies demonstrated that BHMT is often deregulated in fish exposed to pollutants (Evrard et al., 2010; Marchand et al., 2006; Williams et al., 2008). BHMT gene expression was also measured by RT q-PCR in the livers of *P. flesus* exposed to the same contamination protocol (Dupuy et al., 2014). This recent study demonstrated that a significant increase in the C2-treated fish occurred after 29 days of contamination. These results confirmed the response profile of CYP450-1A gene expression observed in the same study. This suggested a link between BHMT induction and detoxification processes (Dupuy et al., 2014). Other global proteomic or transcriptomic

studies demonstrated that BHMT was deregulated in response to different environmental constraints such as hypoxia (Everett et al., 2012), experimental or seasonal temperature variation (Ibarz et al., 2010; Podrabsky, 2004; Richards et al., 2010), osmotic stress (Diamant et al., 2001) or hydrostatic pressure (Yancey et al., 2002).

To conclude, the current study examined the proteome modifications in the liver of *P. flesus* exposed to an environmentally relevant chemical contamination. Fish were contaminated through food by a PAHs/PCBs mixture reflecting the concentrations found in the Seine estuary (C1) or ten-fold these concentrations (C2). The results indicated the accumulation of several proteins associated to oxidative stress defense. An accumulation of proteins involved in the betaine demethylation pathway and the methionine cycle such as BHMT was clearly observed. This may induce an increase of intermediates molecules into the glutathione synthesis pathway. It may also reflect a potential role for methylation processes into the response of fish to xenobiotics. BHMT may be a link between classical responses to xenobiotic exposure such as detoxification or antioxidant defenses and methylation deregulations such as epigenetic DNA methylation. Further studies may be needed to determine the consequences of the accumulation of this protein which is often deregulated in fish exposed to xenobiotics. The potential of this protein as a new molecular biomarker to evaluate environmental chemical contaminations may be also studied.

Acknowledgments

We would like to acknowledge Carole Capitaine (LEMAR, UBO, France) for her technical support and Claire Quentel and François Lamour (ANSES, Plouzané, France) for the animal care and the precious advice. We are grateful to Anne-Marie Le Quellec and Maelle Couville for PCBs analyses and Mehdi Taiya (MS platform, UBO, France) for his help in proteins

identification. A special thank goes to Julie Dubois and Patricia Guinot, post-doctorant and English teacher, respectively (University of Cergy-Pontoise, France). This work was funded by- the European Interreg IVa France (Channel) / England DIESE program and the French ONEMA (office national de l'eau et des milieux aquatiques).

Article 3: Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions

Responses of the European flounder (Platichthys flesus) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions

**Célie Dupuy, Claire Galland, Alain
Devaux, Sylvie Bony, Véronique Loizeau,
Morgane Danion, Vianney Pichereau,
Michel Fournier, et al.**

**Environmental Science and Pollution
Research**

ISSN 0944-1344

Volume 21

Number 24

Environ Sci Pollut Res (2014)

21:13789-13803

DOI 10.1007/s11356-014-2563-y



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions

Célie Dupuy · Claire Galland · Alain Devaux ·
Sylvie Bony · Véronique Loizeau · Morgane Danion ·
Vianney Pichereau · Michel Fournier · Jean Laroche

Received: 10 October 2013 / Accepted: 16 January 2014 / Published online: 7 February 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract A multibiomarker approach was developed to evaluate the juvenile European flounder responses to a complex mixture of 9 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and 12 polychlorinated biphenyls (PCBs). Exposure was performed through contaminated food pellets displaying: (1) PAH and PCB levels similar to those detected in the heavily polluted Seine estuary, respectively in sediments and in flatfish and (2) ten times these concentrations. Several biomarkers of the immune system (e.g., lysozyme concentration and gene expression of complement component C3 and TNF-receptor), DNA damage (e.g., Comet assay), energetic metabolism (e.g., activity of cytochrome C oxidase), detoxification process

(e.g., cytochrome P450 1A1 expression level: CYP1A1; betaine homocysteine methyl transferase expression level: BHMT) were investigated after 14 and 29 days of contamination, followed by a 14-days recovery period. After 29 days of contamination, the detoxification activity (CYP1A1 expression level) was positively correlated with DNA damages; the increase of the BHMT expression level could also be related to the detoxification process. Furthermore, after the recovery period, some biomarkers were still upregulated (i.e., CYP1A1 and BHMT expression levels). The immune system was significantly modulated by the chemical stress at the two concentration levels, and the lysozyme appeared to be the most sensitive marker of the mixture impact.

Responsible editor: Philippe Garrigues

C. Dupuy (✉) · C. Galland · V. Pichereau · J. Laroche
UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des Sciences de
l'Environnement Marin LEMAR, Institut Universitaire Européen de
la Mer, Université Européenne de Bretagne, Université de Bretagne
occidentale, Plouzané 29280, France
e-mail: cel.e@hotmail.fr

C. Dupuy · M. Fournier
Institut National de la Recherche Scientifique-Institut
Armand-Frappier (INRS-IAF), 31 Boulevard des Prairies, Laval,
Québec H7V 1B7, Canada

A. Devaux · S. Bony
Université de Lyon, UMR 5023 LEHNA CNRS,
Villeurbanne F-69100, France

A. Devaux · S. Bony
INRA, USC 1369 IGH, ENTPE, F-69518, Vaulx-en-Velin, France

V. Loizeau
Unité Biogéochimie et Ecotoxicologie, IFREMER, Centre de Brest,
BP70, Plouzané 29280, France

M. Danion
Laboratoire Ploufragan-Plouzané, Agence nationale de sécurité
sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, ANSES,
Technopôle Brest-Iroise, Plouzané 29280, France

Keywords Mixture of contaminants · Fish · Biomarker ·
Immunotoxicity · Detoxification process · DNA damage ·
PAHs · PCBs

Introduction

Aquatic environments can be affected by complex mixtures of chemicals, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), heavy metals, pesticides, and endocrine disrupting chemicals. The safety levels of these contaminants are based on single substance exposure studies; however, when present in a mixture, a contaminant can be more or less toxic because of possible chemical interactions between toxicants, commonly called the “cocktail effect” (Celandier 2011). Thus, in different mixtures, contaminants can produce synergistic or antagonistic effects on the exposed organisms.

The European flounder, *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758), is considered as a pertinent sentinel species for water quality monitoring in coastal marine systems (ICES, 2011); thus, numerous studies have assessed the biological effects of

contaminants on natural populations of *P. flesus* (e.g., Evrard et al. 2010a; Vethaak et al. 2011). In field studies, contaminant load and responses from the subcellular (i.e., molecular responses, such as the modulation of biotransformation enzyme activity, DNA damages, etc.) to the organism level (i.e., growth, disease occurrence, etc.) are nowadays frequently assessed in order to explore possible cause-and-effect relationships between chemical stress and biological responses; this integrative approach on the flounder responses in estuaries is usually efficient to diagnose the general level of chemical stress (Williams et al. 2011; Laroche et al. 2013). However, complementary studies must be conducted in laboratory to better explore the natural variability (i.e., noise) versus the contaminant-induced stress (i.e., signal) for numerous biomarkers in the context of pollutant mixtures.

The present study is exploring (1) the baseline of several biomarkers involved in the immunity, metabolic rate, and DNA damage and (2) their responses for flounders exposed to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions. A cocktail of 9 PAHs and 12 PCBs commonly observed in the field was prepared. Two exposures were performed through contaminated food pellets displaying : (1) PAH and PCB levels similar to those detected in the heavily polluted Seine estuary, respectively, in sediments (Cachot et al. 2006) and in flatfish (Loizeau and Abarnou 1995; Abarnou and Duchemin 2008; Gilliers et al. 2004) and (2) ten times these concentrations.

Flounders were contaminated by the pellets during 29 days and then fed with uncontaminated food for a 14-day recovery period. Immune markers were analyzed during this experiment, considering particularly the lysozyme activity and the gene expression level of complement unit 3 (C3) and tumor necrosis factor receptor (TNF-R). Contaminants may modulate the immune system by immunosuppression, autoimmunity reactions, or hypersensitivity responses (Zelikoff 1998). Immune parameters can be modulated by many stressors and thus are not considered as specific markers (van der Oost et al. 2003); however, immunotoxicologic approaches appear very pertinent in ecotoxicology because alterations of the immune functions may conduct to an increased fish susceptibility to parasites and thus to a lower fitness (e.g., Dautremepuits et al. 2004; Danion et al. 2012).

Lysozyme is an enzyme of the innate immune system, playing a role in the protection against microbial invasion (Lie et al. 1989). Lysozymes show lytic activity against gram-positive and gram-negative bacteria and play a role in the activation of complement system and phagocytes (Saurabh and Sahoo 2008). Lysozyme level is sensitive to environmental contaminants and is measured on the serum (easy and inexpensive analysis); thus, it could be a convenient parameter for monitoring the impact of pollutants (Bols et al. 2001).

Furthermore, the expression level of two genes (C3 and TNF-R) was also measured in the flounder liver. Complement C3 is a central protein involved in both classical and alternate pathways of complement (Rehana and Kini 2008). The complement system is involved in modulation of phagocytosis, lysis of cells, and the inflammatory response (Ye et al. 2011; Boshra et al. 2006). A modulation of C3 mRNA expression was observed in fish after a long-term exposure or between fish living in pristine versus polluted habitats; thus several studies observed an induction of C3 mRNA by the pollutants (Holth et al. 2010; Straub et al. 2004). On the other hand, Williams et al. (2003) showed a downregulation of C3 mRNA in European flounders living in a contaminated estuary.

Tumor necrosis factor (TNF) and its cellular receptor (TNF-R) are proteins implicated in cellular signaling pathways involving inflammation, apoptosis, necrosis, and lymphocyte homeostasis (Smith et al. 1994; Wiens and Glenney 2011). TNF-alpha is a TNF that can also modulate the biotransformation process by the downregulation of cytochrome P450 activities in fish (Reynaud et al. 2005). Moreover, Bado-Nilles et al. (2011) observed an upregulation of TNF-alpha on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, after 7 days of exposure with light cycle oil. No sequence of TNF-alpha is known for the European flounder, *P. flesus*, therefore we decided to study the expression of the corresponding cell-surface receptors (TNF-R).

The molecular responses to chemical stress were also analyzed in flounder livers, considering the expression level of two genes: the betaine homocysteine S-methyltransferase (BHMT) and the cytochrome P450 1A1 (CYP1A1). BHMT is an enzyme implicated in the regeneration of methionine by remethylation of homocysteine. Induction of BHMT was underlined in several studies on the flounder responses to contaminants in experimental context and in the field which suggested that BHMT could be involved in detoxification process (Evrard et al. 2010a; Marchand et al. 2006). CYP1A1 has an important function in the biotransformation of many xenobiotics (Sarasquete and Segner 2000). Induction of flounder mRNA CYP1A1 by the pollutants was also demonstrated in laboratory and in the field (Eggens et al. 1996; Evrard et al. 2010a). Moreover, several studies suggested that the immunotoxic effects of contaminant could be induced by the upregulation of CYP1A1 (e.g., Carlson et al. 2004).

The flounder cellular responses to chemical stress were also considered in this study through the assessment of DNA damage in erythrocytes, using the Comet assay. This assay reveals a large array of DNA damage such as DNA single- and double-strand breaks, and alkali-labile and incomplete repaired sites at the cellular level. Several studies have underlined the interest of the Comet assay to assess the genotoxic effects of contaminants such as PAHs and PCBs in fish tissues (e.g., Devaux et al. 1998; Flammarion et al. 2002; Costa et al. 2008).

Lastly, the cytochrome C oxidase (CCO) activity was measured in fish muscle. CCO is the terminal enzyme of electron transport chain of the mitochondria (complex IV); this aerobic enzyme may constitute an excellent proxy of the fish metabolic capacity (Cohen et al. 2005; Pelletier et al. 1994).

The major objective of the present study is to integrate the molecular, cellular, and physiological responses of the flounder to the food contamination with a mixture of PAHs and PCBs, during a 1-month period, followed by a recovery period where the reversibility of the different marker responses will be explored.

Materials and methods

Experimental design

Juveniles of *P. flesus* (cohort 0+; average weight, 25.2 ± 8 g, and average total length, 11.9 ± 1.5 cm) were purchased in a farm (Fishlab, Denmark) in October 2010, then reared in our laboratory in experimental tanks, the water being directly collected in the Bay of Brest (salinity ≈ 35 g/l) and maintained at a temperature between 14 and 17 °C. After a 14-day acclimation period to the laboratory conditions, several fish groups were contaminated through food, by a mixture of pollutants (PCBs and PAHs). Levels and profiles of PCBs and PAHs were representative of those detected in sediments and fish of the Seine estuary (C1 condition). C2 condition was characterized by a ten times higher concentration. Mixtures were prepared, and pellet contaminant load was measured by the LABOCEA laboratory (public laboratory, Plouzané, France), in order to check the efficiency of the impregnation (Table 1). Six fish groups were considered: a control group (pellets without iso-octane), a control group with the solvent (pellets with iso-octane), and two contaminated groups (C1 and C2) in batch replicates.

After the acclimation period, ten fish were sacrificed as a control (t_0), and then ten fish per group were sacrificed after 14 and 29 days of contamination. After this contamination period, fish were fed with normal commercial pellets, and ten fish per group were sacrificed after a 14-day recovery period (i.e., 45 days after t_0). As a whole, in this work, 200 fish were sacrificed: ten fish control and ten fish control with solvent at t_0 ; then ten fish control, ten fish control with solvent, and ten fish in C1 and C2 groups in duplicate at each sampling date.

One day before t_0 , animals were tagged, and their standard length (Lsd, i.e., until the hypural joint) and total weight were measured to the nearest 0.1 cm and 0.1 g, respectively. Each

sampling operation was conducted with the following protocol:

1. The Lsd and total and gutted weight were measured per fish, and a blood sample was collected from the caudal vein with a heparinized syringe. One part of each blood sample was diluted (1/100) in a cryopreservative buffer (Evrard et al. 2010a) for the Comet test, and a second part was centrifuged (5 min, $5,000 \times g$) to obtain plasma for the lysozyme activity analysis. All samples were frozen in liquid nitrogen.
2. The fish were killed by concussion, and fragments of liver and muscle were quickly dissected and frozen in liquid nitrogen, eviscerated fish being stored at -20 °C for further PCB analysis.

Visual inspection did not reveal any trace of liver pathology or parasite infection. All experiments were performed according to the guidelines laid down by the French *Ministère de l'Agriculture* and the European Union council directive for the care and use of laboratory animals.

Biometric indices

The Fulton's condition factor (CF) was calculated by the formula, $CF = 100 \times W/Lsd^3$, where W is the fish gutted weight (grams) and Lsd is the standard length (millimeters) of each fish.

The specific growth rate (SGR) of each fish was estimated using the formula: $SGR (\% \text{ per day}) = 100 \times (\ln(W_t) - \ln(W_0)) / (t - t_0)$, where W_0 and W_t are the fish weights at t_0 and t days, respectively (Talbot 1993).

Food preparation and PCB analyses in food and fish tissues

Commercial food (Inicio plus, 1.9 mm), obtained from Biomar (France), consisted of a formulated feed containing 61 % crude protein and 33 % crude fat. Spiked food was prepared by batch to avoid deterioration and by slowly adding a solution in iso-octane of known amounts of 12 PCB congeners and 9 PAH (AccuStandard Inc., New Haven, USA, purity above 98 %) to food pellets in order to prepare diets (Table 1). PCBs mixtures were composed of the seven indicator PCB congeners (CB28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) and a few others to describe a larger range of chlorination from 3 to 8 chlorine atoms (CB105, 149, 156, 170, 194). The latter compounds were chosen because they can highlight any underlying mechanisms acting on the distribution of organic contaminants in biota, i.e., bioaccumulation or biotransformation. CB153 is not metabolized and is used as a representative of all 12 congeners. PAHs mixtures were composed of nine PAHs of high molecular weight (three to five rings) found in European and American estuaries and already used in several

Table 1 Targeted and measured concentrations (nanograms per gram) of PAHs and PCBs in the fish pellets

	Control	C1		C2	
	Measured concentration	Targeted concentration	Measured concentration	Targeted concentration	Measured concentration
PAH					
Fluoranthene	2.3	210	189	2,100	2,072
Pyrene	3.2	200	176	2,000	1,916
Benzo(a)anthracene	0.7	70	49.6	700	640
Chrysene	1.5	130	84.8	1,300	1,144
Benzo(b)fluoranthene	2.3	170	116	1,700	1,501
Benzo(k)fluoranthene	0.7	60	43.3	600	529
Benzo(a)pyrene	1.3	60	42.1	600	517
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	nm	50	nm	500	514
Benzo(ghi)perylene	0	50	54	500	435
∑ PAH	12	1,000	754.8	10,000	9,268
CB					
CB 28	0	5	4.2	50	47.1
CB 52	0.4	25	24.3	250	252
CB 101	1.6	50	43.8	500	470
CB 149	2.1	50	42.8	500	477
CB 118	1.1	50	41.7	500	465
CB 153	3.3	100	86	1,000	939
CB 105	1.4	25	20.3	250	238
CB 138	2.6	100	79.4	1,000	911
CB 156	1.2	25	20.3	250	218
CB 180	1.4	50	37.9	500	449
CB 170	1.5	25	17.7	250	212
CB 194	0	5	3.5	50	42.5
∑ PCB	16.6	510	421.9	5,100	4,720.6
Total load of contaminants	28.6	1,510	1,176.7	15,100	13,988.6

studies of contamination with PAHs mixtures (e.g., Arkoosh et al. 2001; Bravo 2005; Bravo et al. 2011).

Two diets were prepared: medium and high PCB and PAH mixtures for which targeted concentrations of individual congeners are presented in Table 1. PAHs being metabolized, only the PCBs concentrations were assessed to confirm the fish contamination. Batches of spiked food were stored in amber containers in a cool, dark place throughout their use (circa 1.5 months). Individual PCB congener concentrations were determined in each batch of spiked food (Table 1). Non-spiked food was also analyzed for PCB levels, and concentrations were between <0.05 ng/g dry weight (dw) and 3.0 ng/g dw (mean value calculated on five replicates) depending on the congener. In addition to congeners included to spike the contaminated food, CB 31 (not detected; nd), CB 77 (nd), CB110 (0.75 ng/g dw), CB132 (nd), CB128 (nd), CB187 (nd) non-added congeners, and p,p'-DDE (3.50 ng/g dw) were measured.

The PCB analysis in eviscerated fish was performed according to the protocol described by Bodiguel et al. (2009). One gram of freeze-dried eviscerated fish was spiked with recovery standards (CB30, CB198, CB209) and was extracted in a hot Soxhlet extraction apparatus (Soxtec) over 1.5 h with a hexane/acetone mixture (80:20). The amount of extracted fat was determined by gravimetric analysis. Then, two successive cleanups were performed on the extractable material. First, lipids and co-extractable material were destroyed by adding concentrated sulfuric acid. The cleaned extract was then purified by adsorption chromatography on a Florisil column (16 % MgO+84 % SiO₂, activated for 1.5 h at 500°C, deactivated with 3 % of demineralized water) and eluted with pentane. Finally, PCB congeners were analyzed by gas chromatography with an electron capture detector, on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 (60 m length, internal diameter 0.25 mm, and 0.15 µm phase film thickness) and HT8 (50×0, 22×0.25) capillary columns following optimized

conditions described by Jaouen-Madoulet et al. (2000). The system was calibrated within quite a large range using a six-point calibration curve to define the linearity range of our detector for all contaminants. The relative precision of the method was checked for this type of sample by analyzing five aliquots of a homogeneous tissue preparation of fish muscle. The results showed standard deviations of less than 10 % for all congeners, indicating that the method had a satisfactory reproducibility. During analysis of the real samples, analytical blanks were systematically measured for every ten samples. The blank concentrations were always less than the concentrations of the lowest standards of all congeners.

Finally, five replicates of a reference material, BCR-SRM1588 (cod liver oil) were analyzed to determine the accuracy and precision of the method. PCB recoveries varied between 74 % and 125 %. Furthermore, the RSD values ranged from 4 % to 19 %, with a mean of 10 % for all PCBs. All of these results were in agreement with certified reference values and published data (Schantz et al. 1993). The BE-Ifremer unit takes part in Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe (QUASIMEME); inter-comparison exercises for PCBs in biota and Z-scores were satisfactory (i.e., between -2 and +2).

Comet assay

In this study, the Comet assay was carried out on flounder erythrocytes according to the procedure described by Singh et al. (1988) with slight modifications detailed in Evrard et al. (2010a). After cell lysis and electrophoresis, DNA was stained with 0.05 mM ethidium bromide and scored using an Axioskop epi-fluorescence microscope (Zeiss™) and the Comet assay IV image analysis system (Perceptive Instruments Ltd., Haverhill, UK). Randomly selected cells from two replicated slides (50 cells per slide) were analyzed. The percentage of DNA in the Comet tail (median % tail intensity) was chosen as the most reliable and meaningful Comet measurement (Jha 2008).

Lysozyme

The assessment of plasma lysozyme level was carried out by the turbidimetric method of Parry et al. (1965). A suspension of 110 µL *Micrococcus lysodeikticus* (10 µg/ml, 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 6.4) was mixed with 40 µL of serum in a 96-well plate. The reaction was carried out at room temperature and read at 450 nm at 1-min intervals for 20 min, homogenizing before each run. On each 96-well plate, the measure was also carried out on a known lysozyme concentration standard (0 to 0.75 µg/mL) to calculate the concentration of lysozyme in each plasma sample. Protein concentrations in plasma sample were determined by the method of

Bradford using bovine serum albumin as a standard (BIO-RAD Laboratories, USA).

CCO (cytochrome C oxidase)

The CCO activity was measured at 22 °C by a microplate spectrophotometric assay in muscle S9 fraction (Smith and Conrad 1956; Théron et al. 2000). Absorbance changes were monitored at 550 nm during 8 min. Protein concentrations were determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard (BIO-RAD Laboratories, USA).

Gene expression

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Applied Biosystems™) at a concentration of 1 mL/50 mg of tissue. Each liver was homogenized in Trizol using a Precellys-24® ceramic bead-based homogenizer (Bertin Technologies™). Samples were treated with RTS DNase Kit (MO BIO) to prevent DNA contamination. The purity and concentration of samples were determined using a NanoDrop 8000® spectrometer (Thermo Scientific™). Purity was assessed using the ratios A260/A230 and A260/A280. RNA quality was assessed by capillary electrophoresis using the Agilent RNA 6000® Nano Assay Kit on the Agilent 2100® bioanalyzer (Agilent Technologies™) or by migration on agarose gel (1.5 %). Reverse transcription PCR (RT-PCR) was carried out using 1 µg total RNA from each sample with RevertAid H minus First Strand, cDNA Synthesis Kit® (Fermentas™). A RT-PCR was carried out using a RNA mixture of samples coming from each experimental condition. This mixture is a control used on each run of real-time quantitative PCR (qPCR).

The mRNA expression level was explored for the following genes: BHMT, C3, TNF-R, and CYP1A1. Two housekeeping genes were tested: alpha-tubulin and 18S. No significant differences of CP (crossing-point threshold) were observed for alpha-tubulin between the control and the contaminated fishes; furthermore, Alpha-tubulin showed the lowest variation coefficient and thus was retained as the housekeeping gene in our analysis. Primers of CYP1A1, Alpha-tubulin, 18S, and BHMT were obtained in the literature (Table 2). Primers of C3 and TNF-R were designed considering the sequences available on Genbank and using Primer 3 software (Rozen and Skaletsky 1999).

The real-time qPCR amplifications were carried out in triplicate with the Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix® (Thermo Scientific™). The final volume of reaction was of 25 µL with 1 µL of cDNA (1/40 dilution), 12.5 µL of Absolute QPCR SYBR Green Mix® (Thermo Scientific™), 1.75 µL of each primer (1 µM), and 8 µL of water. A negative control was carried out (each total RNA sample with DNase treatment). Each run included cDNA of sample, cDNA of

Table 2 Primer sequences used for qPCR

Genes	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	Origin
α -Tubulin	CAC-AGC-CTC-ACT-TCG-TTT-TG	AGA-TGA-CAG-GGG-CAT-AGG-TG	Leaver et al. (2010)
18S	GTC-TGG-TTA-ATT-CCG-ATA-ACG-AAC-GAG-ACT-CTA	TGC-TCA-ATC-TCG-TGT-GGC-TAA-ACG-CCA-CTT-G	Evrard et al. (2010a, b)
CYP1A1	GCC-AAC-GTG-ATC-TGC-GGA-ATG	AAG-CCG-ACC-AGC-TCC-TGA-TC	Calvès (2011)
BHMT	AGA-GAG-GCC-TAC-AAG-GCT-GG	GTG-TGC-ATC-TCC-AGA-CCA-GCG-C	Evrard et al. (2010a, b)
TNF-R	CAG-CCG-AAT-CTC-AGT-GAT-GG	CAG-TTG-GAT-GCC-AAG-TCA-GC	Designed from ES443667.1
C3	ACG-ATG-AAA-GTG-GGC-GTC-TT	TGC-AGT-TCT-CTT-CGG-CAC-AT	Designed from EC379465.1

mixture used as control, blank controls (water) analyzed for each primer pair, and a cDNA mixture analyzed for the housekeeping gene and used to normalize the plates (and take into account variations between plates). The qPCR was carried out using a 7300 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems™) with the following qPCR thermal cycling program—50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, then 40 cycles at 95 °C for 15 s followed by 1 min at 60 °C. A melt curve was carried out to confirm the specificity of the reaction with the following program—95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and an increase of temperature by 0.5 °C each 15 s to 90 °C. PCR efficiency (E) was determined for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of cDNA. Relative expression of the target gene was calculated with the Pfaffl (2001) using Alpha-tubulin as the reference gene :

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

The ratio of a target gene is expressed in a sample versus a control in comparison to a reference gene, where, E_{target} is the qPCR efficiency of a target gene transcript; E_{ref} is the qPCR efficiency of the reference gene transcript; $\Delta CP_{\text{target}}$ is the CP (crossing-point threshold) deviation of control-sample of the target gene transcript; ΔCP_{ref} =CP deviation of control-sample of reference gene transcript.

Statistical analysis

Statistic tests and box plots were carried out using Statistica 10.0 (StatSoft™). Data were not normally distributed, so the Kruskal-Wallis (KW) test was used for inter-condition comparisons. When KW test was significant ($p \leq 0.05$), it was followed by a post hoc test: a multiple bilateral comparison of mean ranks. No significant difference was detected over the whole markers (KW test, $p > 0.05$) between control group and control group with solvent, between the two groups of C1 and between the two groups of C2, thus the analysis were

conducted pooling the two groups of control, the two groups of C1 and of C2.

Principal component analysis (PCA) was used to develop an integrative approach on the fish responses to contaminants after 14 and 29 days of exposure, considering the three fish groups: control/exposed to C1/exposed to C2. The following variables were considered in the PCA: Lsd, SGR, DNA damage, lysozyme concentration, CCO, and gene expression, all data being standardized (zero mean, unit variance) before the analysis. This analysis produced (1) a correlation circle allowing exploring the relationships between the quantitative variables and (2) the fish distribution on the main factorial plan.

Results

Chemical analyses of pellets and eviscerated fish, and biometric indices

Chemical analyses of pellets indicated that the concentrations of PCBs/PAHs were close to the intended concentrations (Table 1), for both the moderate and the high load of contaminants (C1 and C2).

After the 29-day contamination period, the concentration of PCBs in eviscerated fish was close to the expected concentration, C2 concentration being tenfold higher than C1 (Fig. 1). Furthermore, even after the 14-day restoration period, the levels of PCBs in the eviscerated fish remained high, although a moderate decrease of the contaminant load was detected in the C1 and C2 fish groups, this trend being lower in the C1 fish group (Fig. 1).

No significant difference between CF and Lsd was detected between the different fish groups (control/exposed to C1/exposed to C2) after 14, 29, or 43 days of experimentation.

Comet assay

After 14 days of contamination, no significant differences appeared between the blood cells, DNA damages in control versus exposed fish at both concentrations (Fig. 2). The

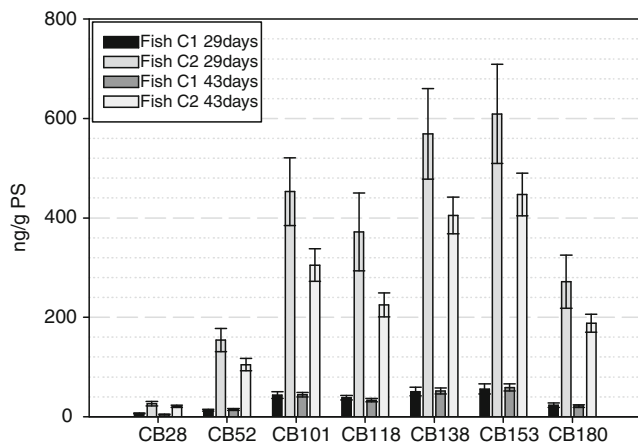


Fig. 1 Measured concentrations of PCBs indicators in eviscerated fish after 29 days of contamination and 43 days of experimentation (29 days of contamination and 14 days of recovery period)

increase in DNA damage became significant in C2 group after 29 days of contamination ($p < 0.01$). After the 14-day restoration period, the level of DNA damage was not significantly different between fish groups and remained low, close to the value observed at the beginning of the experiment (Fig. 2). It has to be noticed that, for the C2 group after 29 days of contamination, a significant Pearson's correlation ($r = 0.964$, $p < 0.05$) was detected between the level of DNA damage and the mRNA level of CYP1A1 (data not shown).

Lysozyme

A significant decrease of the lysozyme activity was detected after 14 days of contamination for the C1 exposed fish compared with other groups (Fig. 3, $p < 0.01$). After 29 days of

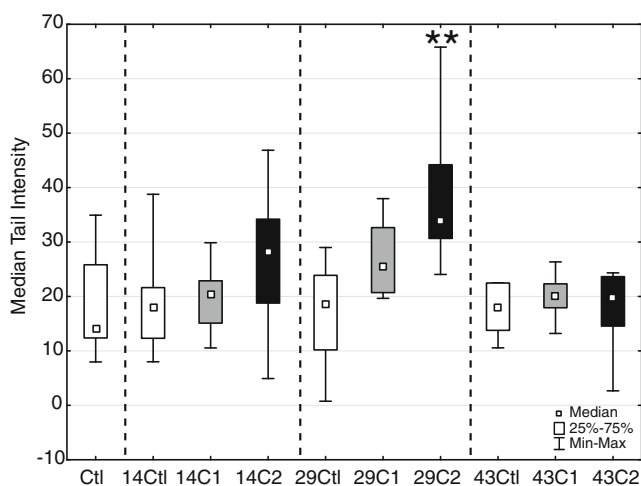


Fig. 2 Primary DNA damage levels expressed as median tail intensity by the Comet assay during the experiment in control (Ctl) and in contaminated conditions (C1 and C2) after 14, 29, and 43 days. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$

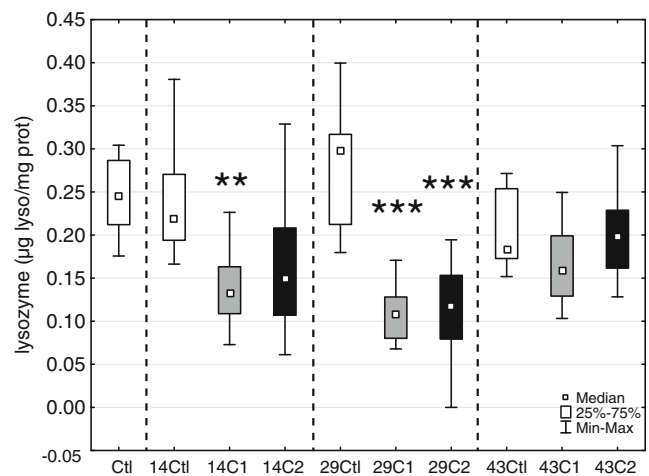


Fig. 3 Lysozyme concentration in plasma during the experiment in control (Ctl) and in contaminated conditions (C1 and C2) after 14, 29 and 43 days. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$

contamination, the lysozyme activity was significantly reduced for both C1 and C2 groups compared with the control (Fig. 3, $p < 0.001$). The levels of lysozyme activity were similar in the three fish groups after the restoration period and not significantly different from levels observed before the contamination.

CCO (cytochrome C oxidase)

No significant difference was detected for the CCO activities among the fish groups, along the whole experiment (Fig. 4); however, the highest and the lowest CCO activities were detected for the C2 fish group after respectively 14 and 29 days of contamination.

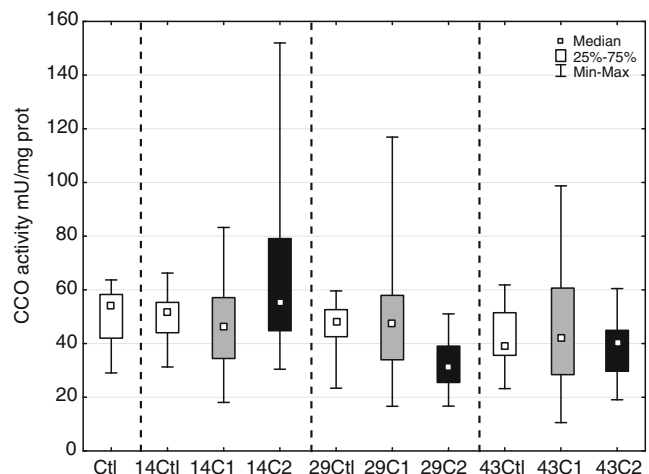


Fig. 4 CCO activity during the experiment in control (Ctl) and in contaminated conditions (C1 and C2) after 14, 29 and 43 days. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$

Gene expression

The BHMT and CYP1A1 expressions were upregulated for the C2 fishes compared with the other groups after 29 days of contamination ($p<0.01$); this upregulation being maintained after the restoration period (Fig. 5, respectively $p<0.01$ and $p<0.05$). The C3 gene expression was upregulated for the C1 and C2 groups after 29 days of contamination ($p<0.01$ and $p<0.001$); the expression levels of this gene were not significantly different between the fish groups after the restoration (Fig. 5). The TNF-R gene expression was upregulated in the C2 fishes compared with other groups, after the 29-day contamination period (Fig. 5, $p<0.01$).

PCA

Two PCAs were carried out on the fish responses after 14 and 29 days of contamination. After the 14-day contamination period, the first and second principal components (axes 1 and 2) accounted for respectively 38.34 % and 16.50 % of the total variance over the whole data set (Fig. 6a). On the first axis of the correlation circle, an opposition was observed

between the left side of the diagram mainly characterized by high CCO and lysosyme activities, high BHMT and CYP1A1 expression levels, and the right side mainly linked to high fish Lsd and SGR (Fig. 6a). The second axis of the correlation circle was mainly linked to DNA damage (Fig. 6a). The distribution of the individuals on the main factorial plan (axes 1 and 2) showed a mixture of individuals coming from the two groups: control and C1 exposed fish (Fig. 6b), the C2 exposed group being mainly localized in the lower part of the diagram and thus showing higher DNA damages. The inter-individual variability in the fish responses of the C2 group was higher to those observed for the control and C1 groups (Fig. 6b).

After the 29-day contamination period, the first and second principal components (axes 1 and 2) accounted for respectively 40.36 % and 19.42 % of the total variance over the whole data set (Fig. 6c). On the first axis of the correlation circle, an opposition was observed between the left side of the diagram mainly characterized by high DNA damage and high expression level of TNF-R, CYP1A1, C3, and the right side of the plan mainly linked to high lysozyme and CCO activities (Fig. 6c). An inverse correlation was detected between

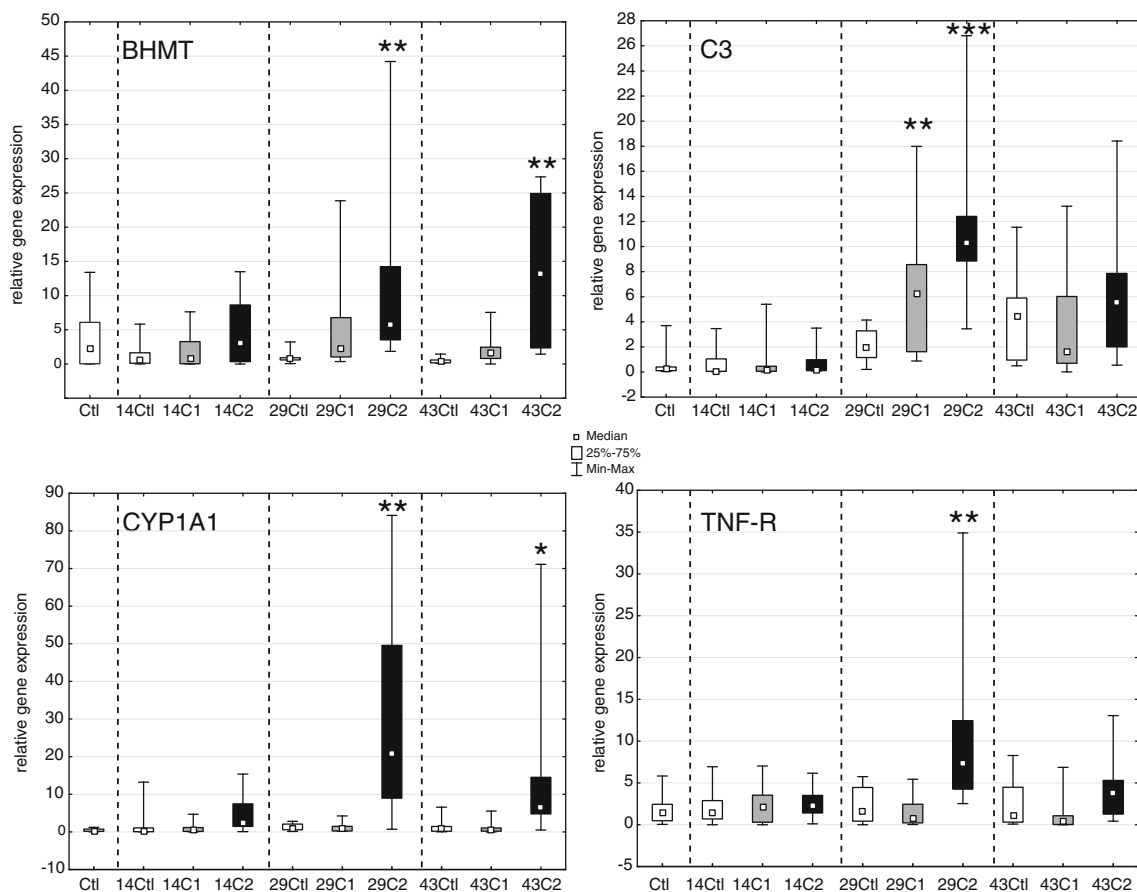


Fig. 5 Expression level of target gene compared with the reference gene (α tubulin) during the experiment in control (Ctl) and in contaminated conditions (C1 and C2) after 14, 29, and 43 days. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$

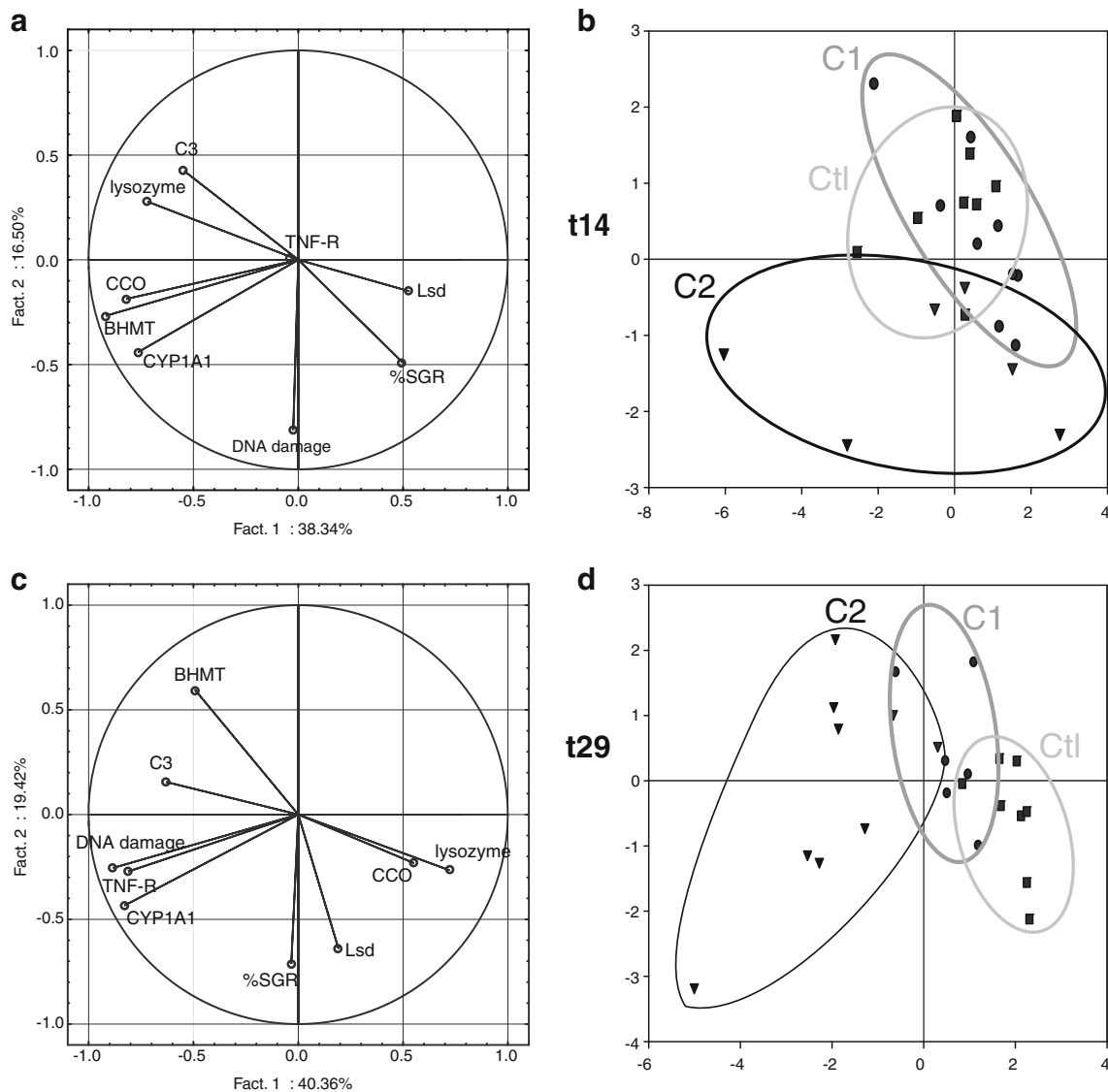


Fig. 6 Principal component analysis (PCA): distribution of the variables on the correlation circle after 14 (a) and 29 days (c) of contamination and distribution of the fishes on the main factorial plan after 14 (b) and 29 days (d) of contamination, considering the three fish groups (Ctl, C1, and C2)

the expression level of BHMT in the upper part of the diagram and the specific growth rate in the lower part of the plan (Fig. 6c). The distribution of individuals after 29 days of contamination showed that the three fish groups (control, C1, and C2) were clearly separated along the first axis (Fig. 6d):

- On the right part of the plan, the control fish showed high CCO and lysozyme activities, reduced DNA damages, and limited expression levels for TNF-R, CYP1A1, C3, and BHMT;
- On the left part of the plan, the C2 fish displayed an inverse trend, i.e., limited CCO and lysozyme activities, high DNA damages, and high expression levels for TNF-R, CYP1A1, C3, and BHMT;

- On the plan center, the C1 fish showed intermediate responses between the control group and the C2 group.

The inter-individual variability in the fish responses of the C2 group after 29 days of contamination was again higher than those observed for the control and C1 groups (Fig. 6d).

Discussion

Contamination by food and fish chemical load

The fish chemical load clearly showed that all flounders exposed to pollutants were efficiently contaminated by the food. Chemical analyses underlined a low interindividual

variability in the fish PCBs concentrations in each condition. Furthermore, after a 29-day contamination period, the ratio of PCBs loads in the group exposed to the high concentration (C2)/PCB loads in the group submitted to the moderate concentration (C1) was close to 10 (i.e., the C2/C1 ratio in the pellets); this result suggests that, in the experimental conditions, the fish PCBs bioaccumulation increased linearly with the level of food contamination. After the 14-day recovery period, fish PCBs concentrations remained high for both C1 and C2 concentrations.

The cocktail of pollutants C1 was designed to reflect the general level of PAHs and PCBs observed in respectively sediment and biota for heavily polluted systems (Cachot et al. 2006; Abarnou and Duchemin 2008). The experimental levels of contamination used in this study allow exploring the complex effects of a cocktail of organic pollutants on detoxification process, DNA damages, and immune and metabolic responses, in environmentally realistic concentration and profile. However, the contaminated estuaries showed diversified cocktails of pollutants including organic and metallic compounds, with different modes of toxic action, and thus leading to very complex responses of the organisms in the field.

Detoxification–biotransformation and genotoxicity

CYP1A1 is implicated in the metabolism of PAHs and of other planar organic pollutants, increasing their hydrosolubility and facilitating further biliary and urinary excretion (van der Oost et al. 2003). Thus, CYP1A1 induction has been used since the 1980s as a biomarker of exposure to such environmental compounds in aquatic ecosystems (Payne and Fancey 1982; Stegeman et al. 1987; Monod et al. 1988). However, it is well known that CYP1A1 can contribute to the metabolic activation of PAHs in aquatic organisms, leading to reactive intermediates and the formation of mutagens and carcinogens (Varanasi et al. 1987). In European flounder, an upregulation of CYP1A1 has been observed both in laboratory and in the field after PCBs and/or PAHs exposure (Eggen et al. 1996; Lewis et al. 2006; Evrard et al. 2010a).

In the present study, the PCBs–PAHs cocktail induced an upregulation of the CYP1A1 expression for the higher concentrated mixture, after a 29-day contamination period. This upregulation was maintained after the 14-day recovery period and was probably linked to the presence in fish tissues of compounds displaying low biotransformation rates, probably PCBs as suggested by the chemical analysis; thus the PCBs concentrations remained high after the 14-day recovery period, whereas the PAHs were probably quickly metabolized (PAH metabolites have not been measured because of the small-sized gall-bladder).

Similarly, the expression of BHMT was also upregulated after 29 days of contamination with the higher dose. This enzyme, catalyzing the methylation of homocysteine to

methionine, is probably involved in phase II detoxification (Marchand et al. 2006; Evrard et al. 2010b; Williams et al. 2008). This upregulation was maintained after the 14-day recovery period. The convergent results between CYP1A1 and BHMT expressions along the contamination and recovery periods might confirm the implication of BHMT in detoxification processes. Along this experience, proteomic analyses underlined a co-accumulation of BHMT, GST, and GPx in European flounders contaminated with this PAHs/PCBs cocktail (unpublished results). It is suggested that BHMT might be involved in a pathway leading to the production of glutathione, allowing the excretion of conjugated xenobiotics by GST or anti-oxidative defenses by GPx.

DNA damage in flounder erythrocytes assessed in the present study through the Comet assay can be considered as a relevant biomarker of exposure to environmental contaminants as demonstrated in other fish species (Frenzilli et al. 2009; Devaux et al. 1998; Jha 2008). If PAHs metabolites are well-known genotoxicants, PCBs genotoxicity remains more controversial, depending on the PCBs congeners (Belpaeme et al. 1996). In the present study, the increase in DNA damage detected after 29 days exposure to the highest cocktail concentration followed by the return to its baseline DNA damage level after the restoration period suggest that PAHs are efficiently biotransformed by CYP1A1 and could mainly be responsible for the measured genotoxicity. This hypothesis is strengthened by the existing correlation between the levels of DNA damage and mRNA CYP1A1 in C2 group after 29 days of exposure. A decrease in DNA damage to its basal level after the recovery period indicates that DNA damage was repaired, suggesting that during this period the level of PAH metabolites was probably below the critical threshold value necessary to induce genotoxicity.

Genotoxicity observed in flounder exposed to PAHs and PCBs mixture could result from various mechanisms. PAHs exposure can lead to the formation of DNA strand breaks measured by the Comet assay that are the results of incomplete repair of DNA adducts or of alkali-labile sites due to DNA adduct depurination (Speit and Hartmann 1995; Sage and Haseltine 1984). Apart from DNA damage due to highly electrophilic PAHs metabolites, genotoxicity could be due to the generation of reactive oxygen species (ROS) known to take place after PAHs and PCBs exposure, in particular, in fish (Schleizinger et al. 2006; Lemaire and Livingstone 1993). Quinone metabolites of PCBs or PAHs can generate ROS by redox cycling finally leading to DNA strand breaks revealed by the Comet assay (Bolton et al. 2000; Ludewig et al. 2000). It is suggested that future exploration on the impacts of mixture of PCBs and PAHs on fish should consider (1) supplementary markers of oxidative stress, (2) to collect bile for the analysis of PAH metabolites, allowing to better explore the relationships between exposure, biotransformation, and genotoxicity.

In the present study, food contamination level in C1 group did not induce any alteration of CYP1A1 expression or an increase in DNA damage, although similar PAHs and PCBs concentrations led to significant DNA damage in flatfish from the heavily polluted Seine estuary (Akcha et al. 2003). This difference could probably be explained by the rather limited exposure duration time in our experiment (29 days). In the field, juvenile flatfish must stay several months in polluted estuaries before significant biomarker responses could be detected (Evrard et al. 2013). Furthermore, the high complexity of the mixture of pollutants (PAHs, PCBs, heavy metals, pesticides) in natural systems could also increase the potential effects of the chemical stress on fish populations.

Immune responses

In the present study, immune biomarkers were clearly modulated by the chemical stress, the decrease of the lysozyme activity being possibly associated to an immunosuppression, whereas the increase of TNF-R and C3 expression levels could indicate an activation of immune system. These results confirm (1) that chemical stress could induce diversified immunomodulatory effects and (2) that a battery of tests is necessary for a better evaluation of the immune system response in polluted environments (Dunier and Siwicki 1993). The inverse trends suggested by lysozyme versus TNF-R/C3 results could be explained by the complexity of the immune system, i.e., xenobiotics could lead to alterations that produce apparently contrasting effects: For example, cadmium can elevate lysozyme activity but impair phagocytosis (Bols et al. 2001).

Furthermore, those contrasted trends previously detected must be analyzed cautiously, considering that markers were assessed at both the protein (lysozyme) and mRNA levels (TNF-R and C3). A higher expression of mRNA is not necessarily accompanied by an increase of protein level, i.e., the toxicant which inhibits the activity of protein may increase the transcription of the gene coding for the protein (Nikinmaa and Rytönen 2011). Moreover, Teles et al. (2011) underlined an increase in TNF α mRNA expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) contaminated with copper, but no change in extracellular TNF α protein concentration was observed, suggesting that translation of TNF α mRNA or secretion of the TNF α protein by the cell is somehow inhibited. In the present experimental context, it is suggested that measures at protein level will be necessary in the future to confirm the induction of TNF-R and C3.

Several authors have evaluated the modulation of TNF system by the measure of TNF-alpha, an extracellular cytokine. But with no sequence of TNF-alpha being available for the European flounder, we chose to study the expression of the corresponding cell-surface receptor (TNF-R), thus exploring an indirect response of TNF system. TNF-R is a receptor of

TNF system implicated in apoptosis and cell necrosis (Smith et al. 1994) and playing a role during acute inflammation (Wiens and Glenney 2011). The presence of high contaminant concentrations may be associated with inflammatory response (e.g., Pacheco and Santos 2002; Leaver et al. 2010; Sheir and Handy 2010). In the present study, the induction of TNF-R mRNA could be the result of fish inflammatory response for the higher concentration of pollutants (C2).

Several studies showed an activation of TNF system in fishes exposed to copper (Teles et al. 2011), effluent wastewater (Kerr et al. 2008), and soluble fraction of light cycle oil (Bado-Nilles et al. 2011). Reynaud et al. (2005; 2008) observed in carp, *Cyprinus carpio*, an interaction between the immune system and biotransformation, suggesting that the immune system could modulate the biotransformation system; they measured a downregulation in cytochrome P450 content after an injection with TNF-alpha. In the present study, after 29 days of contamination, the upregulation of TNF-R had not lead to a downregulation of CYP1A1 but was associated with an upregulation of CYP1A1. So, if TNF-alpha downregulated the cytochrome P450, this regulation possibly occurred after mRNA expression, or the TNF-R considered in our study like a proxy of TNF-alpha could in fact respond differentially. To better explore the TNF system response, it will be necessary in the future to consider the TNF-alpha specific sequence of the European flounder.

Similar to TNF-R in our experimental conditions, C3 was also upregulated after 29 days of exposure to the "high" chemical stress; furthermore, the C3 upregulation was also significant for the "moderate" chemical stress. Thus, we suggest that C3 could be a more sensitive biomarker than TNF-R. The complement system is composed of more than 35 soluble plasma proteins and is initiated by one or a combination of four pathways of activation (Boshra et al. 2006; Amara et al. 2008). C3 is the central protein of complement activation pathways in teleosts like in human (Boshra et al. 2006; Ye et al. 2011). Complement displays lytic, proinflammatory, chemotactic, and opsonic activities and is associated to non-specific phagocytic processes (Watts et al. 2001). Some complement components are upregulated in acute phase responses (Bayne et al. 2001), including the proteins C3 which are upregulated during inflammation (Watts et al. 2001).

Several studies showed an upregulation of mRNA C3 during an experimental contamination with a complex cocktail of PAHs, alkylphenols, and phenol on Atlantic cod, *Gadus morhua* (Holth et al. 2010) or in a field study on winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, comparing polluted versus pristine sites (Straub et al. 2004). On the other hand, Williams et al. (2003) observed a downregulation of C3 in European flounder over polluted sites. Thus, if the C3 and TNF-R mRNA expressions could become pertinent markers in ecotoxicology, more studies will be necessary to better understand the

mechanisms of up- or downregulation of these genes by the contaminants.

In the present study, a significant decrease of the lysozyme activity was detected in our contaminated fish groups compared with the control. Fish lysozyme displays lytic activity against both Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria (Saurabh and Sahoo 2008). Exposure to pollutants could modulate lysozyme levels, but the nature of the modulation seems complex: (1) serum lysozyme activity was elevated in rainbow trout exposed to cadmium, mercury, or zinc (Sanchez-Dardon et al. 1999), and (2) plasma lysozyme concentration decreased in flounder contaminated with DDT adducts and PCBs (Skouras et al. 2003), whereas no modification in lysozyme concentration was detected in plasma of sea bass submitted to heavy fuel oil or light cycle oil (Bado-Nilles et al. 2009). These differences of responses could be explained by the type and the concentrations of contaminants; however, in many fish studies, the general decrease of lysozyme in contaminated contexts appears as a sensitive biomarker (Bols et al. 2001; Saurabh and Sahoo 2008). In our experiment, the measure of lysozyme level appears like a sensitive immune response to contaminants, a signal being detected after only 14 days of exposure in the "moderately" contaminated fish group.

Considering the whole immune responses to contaminants in the present study, we observed after the 14-day recovery period, a restoration of the biological signals towards the initial levels, whatever the considered marker (lysozyme, TNF-R, C3); thus it seems that the contaminants induce a short-time impact on the immune system.

Metabolic activity

In the present study, the estimation of the muscle cytochrome C oxydase activity (CCO) was considered as a potential proxy of the fish metabolic capacity (Cohen et al. 2001). Within each experimental condition (14- and 29-day exposure period, 14-day restoration period), the interindividual variability of the CCO is relatively high in each fish group (control/low contamination/high contamination), thus no significant difference was detected between groups. Again, we suggest that the length of exposure to pollutants in this experiment was too short to induce a significant increase of the energetic metabolism that was only observed after several months of impregnation for juvenile flounders monitored in polluted systems (Evrard et al. 2013).

Integration of fish responses to chemical stress

After a 14-day contamination period, the factorial analysis underlined the main relationships between the fish groups (control versus moderately contaminated versus highly contaminated) and the markers. The main part of the variance in

PCA was probably not related to the chemical stress but could be more related to the flounder physiology; in fact, an opposition between two main physiological trends was observed for the flounder, a "high metabolic rate" (high levels for lysozyme, CCO, BHMT and CYP1A1) versus a "low metabolic rate" characterized by low levels for the previous markers, and also by high length and specific growth rate. This dichotomy in flounder physiology was first observed in a previous study on juveniles collected in French estuaries: the Seine and the Vilaine (Calvès 2011). A secondary part of the variance in PCA was related to the chemical stress, the higher levels of DNA damage being clearly observed for the highly contaminated fish group.

A much contrasted situation was observed by the factorial analysis after a 29-day contamination period. The main part of the variance in PCA was here clearly associated to the chemical stress, i.e., the highly contaminated fish group displayed high levels for DNA damage, TNF-R, and CYP1A1, these biomarkers being positively correlated. This result confirms (1) the potential relationships between CYP1A1 activity and DNA damages frequently suggested by different authors (e.g., Kleinjans and van Schooten 2002; Roy et al. 2003; Wessel et al. 2010) and (2) the link between CYP1A1 activity and immune function in polluted contexts (Reynaud and Deschaux 2006).

Conclusions

The present study underlined an efficient flounder contamination by the food. Thus, the impacts of a mixture of PAHs and PCBs at environmentally comparable concentrations were explored. Particularly after a 29-day contamination period, several biomarkers were clearly affected by the chemical stress. The detoxification activity increased (higher CYP1A1 expression level) in the same way to the rise of DNA damages; furthermore, the increase of the BHMT expression level could also be associated to the detoxification process. The responses of the immune system to the chemical stress were clearly identified but complex to analyze, considering several modulations in the lysozyme activity, and in the expression level of TNF-R and C3.

Acknowledgments This study was supported firstly by the INTERREG IV program: DIESE (50 % of a PhD grant was obtained by the first author, for the development of immune markers in ecotoxicology) and secondly by the DEVIL-INERIS program and by the EVOLFISH project (ANR-VMCS). Financial support was also provided by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. Michel Fournier) and Collège Doctoral International de l'Université Européenne de Bretagne. Authors thank Carole Capitaine for her excellent technical assistance and Anne-Marie-Le Guellec and Maelle Courville for PCB analyses.

References

- Abarnou A, Duchemin J (2008) Distribution et devenir de contaminants persistants dans les écosystèmes littoraux. Comparaison Manche ouest-Manche est. Rapport final étude AESN-IFREMER
- Akcha F, Vincent Hubert F, Pfohl-Leszkowicz A (2003) Potential value of the Comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 534(1–2):21–32. doi:10.1016/S1383-5718(02)00244-9
- Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M (2008) Interaction between the coagulation and complement system. In: Lambris JD (ed) Current topics in complement II, vol 632. Advances in experimental medicine and biology. Springer US, pp 68–76. doi:10.1007/978-0-387-78952-1_6
- Arkoosh MR, Clemons E, Huffman P, Kagley AN, Casillas E, Adams N, Sanborn HR, Collier TK, Stein JE (2001) Increased susceptibility of juvenile Chinook salmon to *Vibriosis* after exposure to chlorinated and aromatic compounds found in contaminated urban estuaries. *J Aquat Anim Health* 13(3):257–268. doi:10.1577/1548-8667
- Bado-Nilles A, Quentel C, Thomas-Guyon H, Le Floch S (2009) Effects of two oils and 16 pure polycyclic aromatic hydrocarbons on plasmatic immune parameters in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linne). *Toxicol Vitro* 23(2):235–241. doi:10.1016/j.tiv.2008.12.001
- Bado-Nilles A, Quentel C, Mazurais D, Zambonino-Infante JL, Auffret M, Thomas-Guyon H, Le Floch S (2011) In vivo effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné). *Ecotoxicol Environ Saf* 74(7):1896–1904. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.06.021
- Bayne CJ, Gerwick L, Fujiki K, Nakao M, Yano T (2001) Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Dev Comp Immunol* 25(3):205–217. doi:10.1016/S0145-305X(00)00057-4
- Belpaeme K, Delbeke K, Zhu L, Kirsch-Volders M (1996) Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 11(5):485–492. doi:10.1093/mutage/11.5.485
- Bodiguel X, Loizeau V, Le Guellec A-M, Rouspard F, Philippon X, Mellon-Duval C (2009) Influence of sex, maturity and reproduction on PCB and p, p' DDE concentrations and repartitions in the European hake (*Merluccius merluccius*, L.) from the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Sci Total Environ* 408(2):304–311. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.004
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LEJ (2001) Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev Comp Immunol* 25(8–9):853–873
- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13(3):135–160
- Boshra H, Li J, Sunyer JO (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 20(2):239–262. doi:10.1016/j.fsi.2005.04.004
- Bravo CF (2005) Assessing mechanisms of immunotoxicity for polycyclic aromatic hydrocarbons in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Oregon State University
- Bravo CF, Curtis LR, Myers MS, Meador JP, Johnson LL, Buzitis J, Collier TK, Morrow JD, Laetz CA, Loge FJ, Arkoosh MR (2011) Biomarker responses and disease susceptibility in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed a high molecular weight PAH mixture. *Environ Toxicol Chem* 30(3):704–714. doi:10.1002/etc.439
- Cachot J, Geffard O, Augagneur S, Lacroix S, Le Menach K, Peluhet L, Couteau J, Denier X, Devier MH, Pottier D, Budzinski H (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat Toxicol* 79(3):257–267
- Calvès I (2011) Effets du réchauffement climatique, de l'hypoxie et de la contamination chimique sur les réponses évolutives de populations de flet (*Platichthys flesus*). Université de Bretagne Occidentale, Brest
- Carlson EA, Li Y, Zelikoff JT (2004) Benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression. *Toxicol Appl Pharmacol* 201(1):40–52. doi:10.1016/j.taap.2004.04.018
- Celander MC (2011) Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquat Toxicol* 105(3–4, Supplement):72–77. doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.002
- Cohen A, Nugegoda D, Gagnon MM (2001) Metabolic responses of fish following exposure to two different oil spill remediation techniques. *Ecotoxicol Environ Saf* 48(3):306–310. doi:10.1006/eesa.2000.2020
- Cohen A, Gagnon M, Nugegoda D (2005) Alterations of metabolic enzymes in Australian bass, *Macquaria novemaculeata*, after exposure to petroleum hydrocarbons. *Arch Environ Contam Toxicol* 49(2):200–205. doi:10.1007/s00244-004-0174-1
- Costa PM, Lobo J, Caeiro S, Martins M, Ferreira AM, Caetano M, Vale C, DelValls TA, Costa MH (2008) Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): effects of metallic and organic contaminants. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 654(1):29–37. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.04.007
- Danion M, Le Floch S, Castric J, Lamour F, Cabon J, Quentel C (2012) Effect of chronic exposure to pendimethalin on the susceptibility of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* L., to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Ecotox Environ Safe* 79 (0):28–34. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.01.018
- Dautremepuits C, Betoulle S, Paris-Palacios S, Vernet G (2004) Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium sp* (Cestoda). *Aquat Toxicol* 68(4):325–338. doi:10.1016/j.aquatox.2004.04.003
- Devaux A, Flammarion P, Bernardon V, Garric J, Monod G (1998) Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Mar Environ Res* 46(1–5):257–262. doi:10.1016/S0141-1136(97)00105-0
- Dunier M, Siwicki AK (1993) Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish—a review. *Fish Shellfish Immunol* 3(6):423–438
- Eggens ML, Vethaak AD, Leaver MJ, Horbach G, Boon JP, Seinen W (1996) Differences in CYP1A response between flounder (*Platichthys flesus*) and plaice (*Pleuronectes platessa*) after long-term exposure to harbour dredged spoil in a mesocosm study. *Chemosphere* 32(7):1357–1380
- Evrard E, Devaux A, Bony S, Burgeot T, Riso R, Budzinski H, Du M, Quiniou L, Laroche J (2010a) Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers* 15(2):111–127
- Evrard E, Marchand J, Theron M, Pichavant-Rafini K, Durand G, Quiniou L, Laroche J (2010b) Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol* 152(3):321–331. doi:10.1016/j.cbpc.2010.05.009
- Evrard E, Devaux A, Bony S, Cachot J, Charrier G, Quiniou L, Laroche J (2013) Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multistress in the Vilaine estuary, during a 6-month survey. *Environ Sci Pollut Res Int* 20(2):676–689
- Flammarion P, Devaux A, Nehls S, Migeon B, Noury P, Garric J (2002) Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicol Environ Saf* 51(2):145–153. doi:10.1006/eesa.2001.2134

- Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat Res Rev Mutat Res* 681(1):80–92. doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.001
- Gilliers C, Amara R, Bergeron J-P (2004) Comparison of growth and condition indices of juvenile flatfish in different coastal nursery grounds. *Environ Biol Fish* 71(2):189–198. doi:10.1007/s10641-004-0090-2
- Holth TF, Thorsen A, Olsvik PA, Hylland K (2010) Long-term exposure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to components of produced water: condition, gonad maturation, and gene expression. *Can J Fish Aquat Sci* 67(10):1685–1698. doi:10.1139/F10-089
- ICES (2011) Report of the Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC), 14–18 March 2011, Copenhagen, Denmark. ICES CM 2011/ACOM:30. 265 pp
- Jaouen-Madoulet A, Abarnou A, Le Guellec AM, Loizeau V, Le Boulenger F (2000) Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. *J Chromatogr A* 886(1–2):153–173. doi:10.1016/S0021-9673(00)00422-2
- Jha AN (2008) Ecotoxicological applications and significance of the Comet assay. *Mutagenesis* 23(3):207–221. doi:10.1093/mutage/gen014
- Kerr JL, Guo Z, Smith DW, Goss GG, Belosevic M (2008) Use of goldfish to monitor wastewater and reuse water for xenobiotics. *J Environ Eng Sci* 7(4):369–383. doi:10.1139/S08-011
- Kleinjans JCS, van Schooten FJ (2002) Ecogenotoxicology: the evolving field. *Environ Toxicol Pharmacol* 11(3–4):173–179
- Laroche J, Gauthier O, Quiniou L, Devaux A, Bony S, Evrard E, Cachot J, Cherel Y, Larcher T, Riso R, Pichereau V, Devier MH, Budzinski H (2013) Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environ Sci Pollut Res Int* 20(2):738–748
- Leaver MJ, Diab A, Boukouvala E, Williams TD, Chipman JK, Moffat CF, Robinson CD, George SG (2010) Hepatic gene expression in flounder chronically exposed to multiply polluted estuarine sediment: absence of classical exposure ‘biomarker’ signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways. *Aquat Toxicol* 96(3):234–245
- Lemaire P, Livingstone D (1993) Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotics interactions marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends Comp Biochem Physiol* 1:1119–1150
- Lewis NA, Williams TD, Chipman JK (2006) Functional analysis of a metal response element in the regulatory region of flounder cytochrome P450 1A and implications for environmental monitoring of pollutants. *Toxicol Sci* 92(2):387–393. doi:10.1093/toxsci/kf023
- Lie O, Evensen O, Sorensen A, Froydsdal E (1989) Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis Aquat Org* 6(1):1–5
- Loizeau V, Abarnou A (1995) Niveaux de contamination par les PCB dans le réseau trophique du bar et du flet. Rapport scientifique Seine Aval, Thème Edifices Biologiques, 85–120
- Ludewig G, Srinivasan A, Robertson L (2000) Mechanisms of toxicity of PCB metabolites: generation of reactive oxygen species and glutathione depletion. *Cent Eur J Public Health* 8(SUPPL):15–16
- Marchand J, Tanguy A, Charrier G, Quiniou L, Plee-Gauthier E, Laroche J (2006) Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the European flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure. *Mar Biotechnol* 8(3):275–294. doi:10.1007/s10126-005-0099-3
- Monod G, Devaux A, Riviere JL (1988) Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhône. *Sci Total Environ* 73(3):189–201. doi:10.1016/0048-9697(88)90428-7
- Nikinmaa M, Rytönen KT (2011) Functional genomics in aquatic toxicology—do not forget the function. *Aquat Toxicol* 105:16–24
- Pacheco M, Santos MA (2002) Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol Environ Saf* 53(3):331–347. doi:10.1016/S0147-6513(02)00017-9
- Parry RM, Chandan RC, Shahani KM (1965) A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc Soc Exp Biol Med Exp Biol Med (New York, NY)* 119(2):384–386. doi:10.3181/00379727-119-30188
- Payne JF, Fancey LL (1982) Effect of long term exposure to petroleum on mixed function oxygenases in fish: further support for use of the enzyme system in biological monitoring. *Chemosphere* 11(2):207–213. doi:10.1016/0045-6535(82)90168-0
- Pelletier D, Dutil JD, Blier P, Guderley H (1994) Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 164(3):179–190. doi:10.1007/bf00354078
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45
- Rehana S, Kini RM (2008) Complement C3 isoforms in *Austrelaps superbus*. *Toxicol* 51(5):864–881. doi:10.1016/j.toxicol.2007.12.020
- Reynaud S, Deschaux P (2006) The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquat Toxicol* 77(2):229–238. doi:10.1016/j.aquatox.2005.10.018
- Reynaud S, Marionnet D, Taysse L, Deschaux P (2005) Interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha modulate cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 62(3):355–362. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.12.013
- Reynaud S, Raveton M, Ravanel P (2008) Interactions between immune and biotransformation systems in fish: a review. *Aquat Toxicol* 87(3):139–145. doi:10.1016/j.aquatox.2008.01.013
- Roy LA, Steinert S, Bay SM, Greenstein D, Sapozhnikova Y, Bawardi O, Leifer I, Schlenk D (2003) Biochemical effects of petroleum exposure in hornhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA. *Aquat Toxicol* 65(2):159–169. doi:10.1016/S0166-445X(03)00135-8
- Rozen S, Skaletsky H (1999) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, bioinformatics methods and protocols. In: Misener S, Krawetz SA (eds), vol 132. Methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, NJ. pp 365–386. doi:10.1385/1-59259-192-2:365
- Sage E, Haseltine WA (1984) High ratio of alkali-sensitive lesions to total DNA modification induced by benzo(a)pyrene diol epoxide. *J Biol Chem* 259(17):11098–11102
- Sanchez-Dardon J, Voccia I, Hontela A, Chilmonczyk S, Dunier M, Boermans H, Blakley B, Fournier M (1999) Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo. *Environ Toxicol Chem* 18(7):1492–1497
- Sarasquete C, Segner H (2000) Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Sci Total Environ* 247(2–3):313–332
- Saurabh S, Sahoo P (2008) Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac Res* 39(3):223–239
- Schantz M, Parris R, Kurz J, Ballschmiter K, Wise S (1993) Comparison of methods for the gas-chromatographic determination of PCB congeners and chlorinated pesticides in marine reference materials. *Fresenius J Anal Chem* 346(6–9):766–778. doi:10.1007/bf00321288
- Schleizinger JJ, Struntz WDJ, Goldstone JV, Stegeman JJ (2006) Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. *Aquat Toxicol* 77(4):422–432. doi:10.1016/j.aquatox.2006.01.012
- Sheir SK, Handy RD (2010) Tissue injury and cellular immune responses to cadmium chloride exposure in the common mussel *Mytilus*

- edulis*: modulation by lipopolysaccharide. Arch Environ Contam Toxicol 59(4):602–613. doi:10.1007/s00244-010-9502-9
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175(1):184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Skouras A, Broeg K, Dizer H, von Westernhagen H, Hansen PD, Steinhagen D (2003) The use of innate immune responses as biomarkers in a programme of integrated biological effects monitoring on flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea. Helgol Mar Res 57(3–4):190–198. doi:10.1007/s10152-003-0141-7
- Smith L, Conrad H (1956) A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome c by cytochrome c oxidase. Arch Biochem Biophys 63(2):403–413. doi:10.1016/0003-9861(56)90055-8
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. Cell 76(6):959–962. doi:10.1016/0092-8674(94)90372-7
- Speit G, Hartmann A (1995) The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (Comet assay). Mutagenesis 10(6):555–560. doi:10.1093/mutage/10.6.555
- Stegeman JJ, Teng FY, Snowberger EA (1987) Induced cytochrome P450 in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from coastal Massachusetts evaluated by catalytic assay and monoclonal antibody probes. Can J Fish Aquat Sci 44(7):1270–1277. doi:10.1139/f87-150
- Straub PF, Higham ML, Tanguy A, Landau BJ, Phoel WC, Hales LS, Thwing TKM (2004) Suppression subtractive hybridization cDNA libraries to identify differentially expressed genes from contrasting fish habitats. Mar Biotechnol 6(4):386–399. doi:10.1007/s10126-004-3146-6
- Talbot C (1993) Some aspects of the biology of feeding and growth in fish. Proc Nutr Soc 52(3):403–416
- Teles M, Mackenzie S, Boltana S, Callol A, Tort L (2011) Gene expression and TNF- α secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide. Fish Shellfish Immunol 30(1):340–346. doi:10.1016/j.fsi.2010.11.006
- Théron M, Guerrero F, Sebert P (2000) Improvement in the efficiency of oxidative phosphorylation in the freshwater eel acclimated to 10.1 MPa hydrostatic pressure. J Exp Biol 203(19):3019–3023
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol 13(2):57–149
- Varanasi U, Stein JE, Nishimoto M, Reichert WL, Collier TK (1987) Chemical carcinogenesis in feral fish: uptake, activation, and detoxication of organic xenobiotics. Environ Health Perspect 71:155–170
- Vethaak AD, Jol JG, Martínez-Gómez C (2011) Effects of cumulative stress on fish health near freshwater outlet sluices into the sea: a case study (1988–2005) with evidence for a contributing role of chemical contaminants. Integr Environ Assess Manag 7(3):445–458. doi:10.1002/ieam.163
- Watts M, Munday BL, Burke CM (2001) Immune responses of teleost fish. Aust Vet J 79(8):570–574. doi:10.1111/j.1751-0813.2001.tb10753.x
- Wessel N, Santos R, Menard D, Le Menach K, Buchet V, Lebayon N, Loizeau V, Burgeot T, Budzinski H, Akcha F (2010) Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). Mar Environ Res 69(Supplement 1):S71–S73. doi:10.1016/j.marenvres.2010.03.004
- Wiens GD, Glenney GW (2011) Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. Dev Comp Immunol 35(12):1324–1335. doi:10.1016/j.dci.2011.03.031
- Williams TD, Gensberg K, Minchin SD, Chipman JK (2003) A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). Aquat Toxicol 65(2):141–157. doi:10.1016/S0166-445X(03)00119-X
- Williams TD, Diab A, Ortega F, Sabine VS, Godfrey RE, Falciani F, Chipman JK, George SG (2008) Transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to model toxicants. Aquat Toxicol 90(2):83–91. doi:10.1016/j.aquatox.2008.07.019
- Williams TD, Turan N, Diab AM, Wu H, Mackenzie C, Bartie KL, Hrydziusko O, Lyons BP, Stentiford GD, Herbert JM, Abraham JK, Katsiadaki I, Leaver MJ, Taggart JB, George SG, Viant MR, Chipman KJ, Falciani F (2011) Towards a system level understanding of non-model organisms sampled from the environment: a network biology approach. PLoS Comput Biol 7(8):e1002126. doi:10.1371/journal.pcbi.1002126
- Ye R, Lei E, Lam M, Chan A, Bo J, van de Merwe J, Fong A, Yang M, Lee J, Segner H, Wong C, Wu R, Au D (2011) Gender-specific modulation of immune system complement gene expression in marine medaka *Oryzias melastigma* following dietary exposure of BDE-47. Environ Sci Pollut Res 19(7):2477–2487. doi:10.1007/s11356-012-0887-z
- Zelikoff JT (1998) Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? Toxicology 129(1):63–71

Chapitre 4 :
Réponse du Flet Européen *Platichthys
flesus* à la contamination chimique en
conditions environnementales

Introduction

- Les résultats présentés dans le chapitre précédent ont permis de mettre en évidence la dérégulation de nombreuses voies métaboliques en réponse à un cocktail de HAP et PCB, à des concentrations correspondant aux conditions rencontrées dans la Seine. Cependant, les dérégulations sont, pour la plupart, apparues au bout de 29 jours avec la dose la plus forte (10 fois celle présente dans la Seine).

Le but de ce chapitre est d'étudier la réponse des juvéniles de flets européens en conditions environnementales et ainsi d'évaluer si les résultats obtenus en laboratoire sont transposables au terrain mais aussi de caractériser la physiologie des organismes dans 3 estuaires présentant des conditions contrastées.

- Les 3 estuaires choisis sont des estuaires de la zone d'investigation du programme européen interreg DIESE (figure 1):
 - La Seine est un estuaire parmi les plus contaminés d'Europe. Elle présente notamment des niveaux élevés de HAP, PCB et métaux
 - La Tamar est un estuaire du sud de l'Angleterre, présentant une contamination industrielle ancienne et très forte en métaux
 - L'estuaire de la Canche est situé dans une réserve naturelle et est considérée comme site de référence dans de nombreuses études

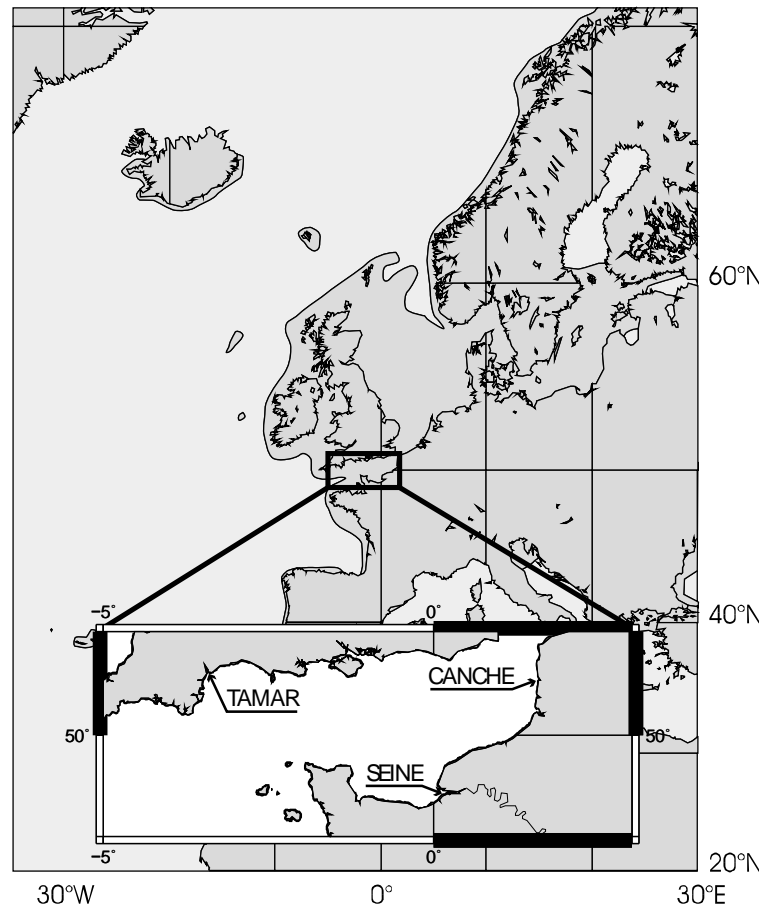


Figure 7 : Localisation géographique des sites de prélèvements

Ce chapitre a pour objectif de rassembler les résultats présentés et discutés de façon développée et argumentée dans les articles « Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries » et « Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the British Channel, by a multiparametric approach » figurant à la suite de cette synthèse.

Plan expérimental

- Modèle : flets juvéniles (0+) prélevés sur le terrain en octobre 2010 (Seine et Canche) et octobre 2009 (Seine, Canche et Tamar)
- Echantillonnage
 - n=30
 - Prélèvement du foie et du muscle, du pronephros ; congélation immédiate dans l'azote liquide
 - L'âge de chaque poisson a été mesuré par lecture sur les otolithes

- Mesures chimiques

Tableau 4 : Teneurs en polluants métalliques (Cuivre, Plomb, Cadmium) dans les foies de flets issus de la Canche, la Tamar, et la Seine. Les teneurs sont mesurées sur 3 pool constitués chacun avec 3 foie de flets. Les valeurs sont exprimées en µg/g de tissu. moyenne±sd

	Cu (µg.g-1)	Pb (µg.g-1)	Cd (µg.g-1)
Seine	9.2 ± 0.73	0.19 ± 0.11	0.257 ± 0.03
Canche	1.833 ± 0.31	0.087 ± 0.03	0.009 ± 0.001
Tamar	8.6 ± 1.67	0.127 ± 0.01	2.167 ± 1.16

- Paramètres biologiques mesurés
 - L'accumulation différentielle de protéines sous l'effet du traitement a été mesurée par électrophorèse en 2 dimensions :
 - Extraction dans du Tris-HCL pH=6.8 au Precellys (Bertin technology)
 - Précipitation au TCA/acetone
 - IEF sur strip pH 3-10 linéaire
 - SDS-page en gradient 10-15% en acrylamide
 - Analyse d'image par le logiciel Prodigy Samespot
 - Identification par spectrométrie de masse MALDI TOF-TOF après digestion trypsique.
 - Des marqueurs des impacts sur le système immunitaire, le métabolisme énergétique ou la détoxification ont été étudiés de façon ciblée (tableau 3). Beaucoup de ces marqueurs sont les même que ceux présentés dans le chapitre 3. Le lysozyme n'a pas été mesuré ici mais l'activité de phagocytose des cellules immunitaires du rein antérieur a été mesurée.

Tableau 5 : Paramètres mesurés dans cette étude

	Expression de gène N=30	protéomique N=4	Activité enzymatique N=30	individu N=30
organe	foie	foie	muscle	Rein antérieur
Système immunitaire	TNF-R, C3	Approche globale et sans <i>a priori</i>		phagocytose
Métabolisme énergétique			CCO	IC

Détoxification	CYP4501A
Métabolisme de la méthionine	BHMT

Résultats et discussion

- L'observation des profils obtenus par électrophorèse en deux dimensions a montré une convergence dans les profils des poissons de la Tamar et de la Seine par rapport aux poissons de la Canche. Les profils observés dans les foies des poissons de la Tamar et de la Seine sont caractérisés par une dérégulation du métabolisme énergétique pouvant refléter une augmentation de la demande énergétique (augmentation de l'accumulation de MDH et FBPA). Cependant, la β -globine, protéine participant au transport de l'oxygène et accumulée en réponse à une augmentation de la demande énergétique (Chapitre3-article 2), semble au contraire diminuer ici. Ces résultats pourraient être expliqués par une adaptation locale. En effet, des adaptations locales ont été décrites chez *P. flesus* dans certaines populations du nord de l'Europe vivant dans des environnements de salinité contrastée. Larsen *et al.* (2007) ont montré que, bien que la différenciation génétique soit faible entre les différentes populations étudiées, celles-ci montraient des capacités différentes notamment dans l'induction de l'ALAS, enzyme catalysant la première étape de la synthèse de l'hème. Par ailleurs, la GST, enzyme impliquée dans les mécanismes de détoxification de phase II et les défenses antioxydantes est également accumulée dans les foies de poisson de la Seine et la Tamar. Enfin, une protéine de la super-famille des vitelline outer layer membrane protein 1 (VMO-I), est significativement accumulée (avec un facteur d'induction de 6.7) dans les foies des poissons de la Seine alors qu'elle est totalement absente chez les poissons de la Canche comme de la Tamar. Cette protéine, produite dans le foie, est impliquée dans la vitellogenèse. Elle pourrait être un marqueur plus précoce que la vitellogenine de la présence de perturbateurs endocriniens dans le milieu.
- Les résultats obtenus par études ciblées vont dans le sens de ceux obtenus par protéomique. Des nuances inter-annuelles et selon les cohortes peuvent néanmoins apparaître :
 - Une augmentation de l'activité CCO traduit une augmentation de la demande énergétique qui pourrait expliquer les différences d'indice de conditions entre les sites. En effet, les poissons des sites pollués (Tamar et Seine), qui présentent un

métabolisme énergétique activé présentent également un indice de condition plus faible.

- Les poissons issus de la Seine et de la Tamar ne montrent pas d'induction de CYP450. Le CYP450 est une enzyme impliquée dans la détoxification des HAP et PCB notamment. La transcription du gène codant cette enzyme est induite après 29 jours de contamination par le cocktail de HAP/PCB (chapitre 3-article 3). Cependant, elle n'est pas induite dans le foie des poissons de la Seine. Ce résultat peut s'expliquer par les différences de concentrations utilisées, les durées d'exposition mais aussi la présence en milieu naturel d'inhibiteurs de CYP450 comme les stéroïdes sexuels. Or, les résultats de 2DE suggèrent la présence de perturbateurs endocriniens dans le milieu. Au contraire, la transcription du gène codant pour la BHMT est induite dans la Seine. L'accumulation de BHMT n'a pas été retrouvée en 2-DE, au contraire de la GST. La BHMT pourrait donc participer aux mécanismes de détoxification dans la Seine.
- Une corrélation existe également entre la BHMT et les modulations du système immunitaire. L'expression des gènes codant pour le C3 et le TNF-R sont induites dans les foies des poissons de la Seine et de la Tamar alors que les poissons de la Seine présentent une activité de phagocytose réduite par rapport aux poissons de la Canche. De même que lors de la contamination expérimentale (chapitre 3), l'étude d'une multitude de biomarqueurs est nécessaire pour appréhender la complexité des régulations et dérégulations du système immunitaire.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des résultats. Les paramètres en bleu sont diminués, et les paramètres en orange sont augmentés sous l'effet de la contamination par rapport au contrôle pour un temps de prélèvement donné. La Canche est considérée comme référence. nm=non mesuré

		Canche 09		Canche 10		Seine 09		Seine 10		Tamar 09				
		0+		0+	1+	0+	1+	0	1+	0+				
								+						
Système immunitaire	Phagocytose	nm				nm	nm	bleu		nm	Activité			
	C3					nm	nm	orange						
	TNF-R					nm	nm	orange						
Métabolisme énergétique	IC					bleu	nm			bleu	individus			
	CCO					orange	nm	orange		activité				
	MDH	nm				nm	nm	orange		2-DE				
	β-globin	nm				nm	nm	bleu						

	FBPA	nm	nm	nm		
	ENO	nm	nm	nm		
Défenses anti- oxydantes/détoxification	GST	nm	nm	nm		
Détoxification	CYP1A		nm	nm		
Métabolisme de la méthionine	BHMT		nm	nm		qPCR
Perturbation endocrinienne	VMO-I	nm	nm	nm		2-DE

Conclusion et perspectives

Les différentes dérégulations observées tant au niveau protéique que sur les marqueurs ciblés peuvent être reliés aux profils de contaminations de chaque estuaire (tableaux 1 et 2 et article 5). En effet, alors que l'étude expérimentale (chapitre 2) a montré une augmentation de la demande énergétique, une modulation du système immunitaire et une induction de systèmes de détoxification, ces mêmes effets généraux sont observés ici dans la Tamar et la Seine, estuaires dans lesquels des niveaux de contaminants chimiques élevés sont mesurés.

Cependant, les réponses observées dans la Tamar et la Seine, bien que convergentes, peuvent présenter des nuances. Par exemple, la VMO-I n'est retrouvée que dans les foies des poissons de la Seine, ce qui suggère la présence de perturbateurs endocriniens dans cet estuaire. Cette hypothèse est corroborée par l'observation d'intersex dans des poissons de la Seine (Minier *et al.*, 2000). De même, l'expression du gène codant pour la BHMT est induit dans les foies de poissons de la Seine chez les 0+ et non chez les poissons de la Tamar. Or, nous avons montré une induction de la BHMT en réponse à un cocktail de HAP/PCB (chapitre 3-article 2 et 3) chez des juvéniles de flets (0+). De même, Marchand *et al.* (2006) ont montré une augmentation de la BHMT après 30 jours de contamination par un cocktail d'herbicides chez des juvéniles de flets. Cependant, Lu *et al.* (2012) ont observé une diminution de l'accumulation de BHMT (2-DE) chez le *Plegoglossus altivelis* en réponse à une contamination aigue au Cadmium et Evrard *et al.* (2010) une diminution de l'expression du gène codant pour la BHMT chez des juvéniles de flets après 15 jours de contamination d'un cocktail de pesticides (glyphosate/AMPA) et 62 jours de contamination d'un autre cocktail (glyphosate/AMPA/mecoprop/acetochlor/2,4D). Ce résultat pourrait traduire à la fois une réponse du cycle de la méthionine différente en fonction de l'âge des individus mais aussi en fonction du type de contaminants présents.

**Article 4 : Comparisons of liver proteomes in the
European flounder *Platichthys flesus* from three
contrasted estuaries**



Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries

Claire Galland, Célie Dupuy, Carole Capitaine, Michel Auffret, Louis Quiniou, Jean Laroche, Vianney Pichereau *

Université de Bretagne Occidentale, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, LEMAR UMR 6539 CNRS/UBO/IRD, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 November 2011

Received in revised form 12 April 2012

Accepted 12 May 2012

Available online 1 June 2012

Keywords:

Estuary

Platichthys flesus

Liver Proteomics

Pollution

Biomarker

ABSTRACT

Estuaries are important areas highly susceptible to anthropogenic degradations like pollution. Estuarine species have thus to cope with many types of constraints depending on the estuaries' characteristics. The European flounder *Platichthys flesus* is considered as a sentinel species for the monitoring of estuarine water quality. In this study, juvenile flounders (0+ group) were sampled from three contrasted Channel estuaries, i.e. the Seine, the Canche and the Tamar, and we characterized their liver proteomes by using a two-dimensional electrophoresis based proteomic approach.

We showed that 27 protein spots differentially accumulated between the 3 populations. Six of these proteins were identified by MALDI TOF–TOF mass spectrometry. Flounders from the Seine and from the Tamar, two highly polluted estuaries, displayed common differences, i.e. an increase of the energetic- and the glutathione-metabolism. The most accumulated protein in the Seine's samples (6.7-fold) was a Vitelline Membrane Outer layer protein 1 homolog, suggesting oogenesis deregulation in these juvenile (sexually immature) flounders. Future works applying this kind of proteomic approach on flounders experimentally exposed to conditions that mimic environmental constraints will help to better understand the significance of these environmental proteomic signatures.

   2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Estuaries are zones of connection between land and sea, that present a very high level of productivity, giving them a high ecosystemic value (Costanza et al., 1997; Courrat et al., 2009). These ecosystems receive freshwater derived from land drainage, often containing high levels of nutrients and organic material, and serve as nurseries for a number of marine organisms (Able, 2005; Vasconcelos et al., 2011). Estuaries are often located near towns and industries and are impacted by a range of human activities. They receive particles carried out within the drainage basin, including urban and industrial development as well as intensive agriculture. Thus, estuarine waters and sediments, that naturally encounter large variations of salinity, oxygen, and temperature, also accumulate xenobiotics such as heavy metals and organic contaminants, that degrade the overall quality of the remaining estuarine habitats for marine organisms (Courrat et al., 2009).

The European flounder, *Platichthys flesus*, is a catadromous fish species widely distributed from Norway to Portugal, spawning in winter in the mouth of the estuaries or at sea, displaying pelagic larvae, and living approximately two years in estuaries at the juvenile stage

(Dando, 2011). *P. flesus* displays a high capacity to adapt to changing environments characterized by reduced salinity, hypoxia and highly variable temperature (Evrard et al., 2010; Hemmer-Hansen et al., 2007; Larsen et al., 2007; Marchand et al., 2010). During the first month of settlement, juveniles are concentrated in low salinity habitats that are commonly described as nurseries for them. Juvenile flatfishes feed on benthic organisms and live in close association with the bottom sediments, where most of the chemicals introduced into aquatic environments by human activities accumulate. They are considered particularly sensitive to the effects of pollution and other types of habitat degradation (Skerritt, 2010), and as a consequence are considered as a valuable sentinel species often used to monitor estuarine water quality (Amara et al., 2009; Leaver et al., 2010; Lyons et al., 2010).

Several biological and biochemical parameters can be measured to assess the extent of environmental contamination (Amara et al., 2009; Lyons et al., 2010; Sarkar et al., 2006). Molecular biomarkers often consist in measuring DNA integrity, or the expression of candidate genes/proteins involved in detoxification such as cytochrome P4501A (CYP1A) or metallothionein, or proteins involved in metabolisms particularly sensitive to a given class of pollutants (e.g., acetylcholinesterase inhibition by neurotoxic agents).

As effectors of cellular mechanisms, receptors, and structure or signaling molecules, proteins are key molecules of the cell machinery and then, of the organisms' functioning. Proteomic tools allow the

* Corresponding author at: Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, LEMAR UMR 6539 CNRS/UBO/IRD, Institut Universitaire Européen de la Mer, Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France. Tel.: +33 2 98 49 86 12; fax: +33 2 98 49 86 09.

E-mail address: vianney.pichereau@univ-brest.fr (V. Pichereau).

identification of proteins whose abundance changes as a result of environmental pressures, thus giving essential information on the actual physiology of organisms under adverse conditions (Tomanek, 2011). In this paper, we developed a global proteomic approach to compare the steady state levels of proteins in the livers of *P. flesus* naturally living in 3 estuaries located in the same geographic area (the Channel, Fig. 1), but contrasted at least in terms of chemical pollution patterns. Indeed, the Canche estuary is located in a natural protected area and could be considered as pristine (Amara et al., 2009), the Seine is one of the heaviest polluted river in France (PAHs, PCBs, metals), since it flows through high populated and industrial regions (Cachot et al., 2006; Schnitzler et al., 2011), and the Tamar is known to suffer from an old industrial pollution by heavy metals (Mighanetara et al., 2009).

2. Materials and methods

2.1. Animal sampling

Juveniles of *P. flesus* were collected in October 2009 (Tamar) and 2010 (Seine and Canche), in 3 European estuaries (Fig. 1): the Seine and the Canche (France), and the Tamar (England). At least 30 individuals were collected in each sampling site, all belonging to the 0+ group and sexually immature (macroscopically undifferentiated). Animals were killed just after capture by cervical dislocation. Their standard lengths (i.e. until the hypural joint) and weights were determined, the body condition index was calculated from these measures by using the formula $100 \times \text{weight} / (\text{standard length})^3$. Data concerning the animals studied in this paper are given in Table 1. The livers were taken up and immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Visual inspection did not reveal any trace of liver pathology or parasite infection. All experiments were performed according to the guidelines laid down by the French “Ministère de l’Agriculture” and the European Union council directive for the care and use of laboratory animals.

2.2. Proteomic analysis

2.2.1. Protein extraction

Frozen fish livers were homogenized in 1 ml of Tris–HCl buffer (100 mM, pH 6.8) containing 1% Protease Inhibitor Mix (GE Healthcare),

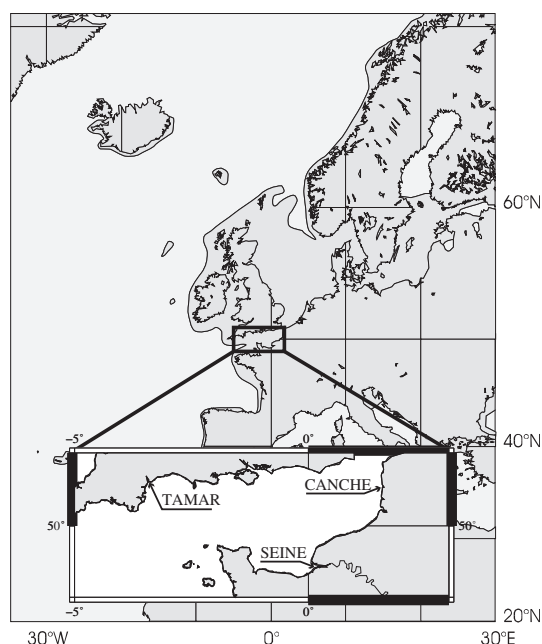


Fig. 1. Sampling locations of the European flounder used in this study.

Table 1

Morphometric measures of the 4 juvenile flounders used in the 2-DE experiments in each estuary. Results are presented in mean \pm sd.

	The Tamar	The Seine	The Canche
Standard length (cm)	9.24 \pm 0.91	12.58 \pm 1.24	11.20 \pm 1.33
Weight (g)	13.20 \pm 3.95	37.36 \pm 10.23	27.48 \pm 8.05
Body condition index	1.49 \pm 0.04	1.70 \pm 0.08	1.72 \pm 0.06

using a Precellys 24 system (Bertin Technologies). The supernatants were removed by centrifugation (12 000 g, 15 min, 4°C) and then incubated at ambient temperature for 30 min with 1% DNase mix (GE Healthcare). Total protein contents were determined using DC protein assay kit (biorad) in triplicate.

The volume corresponding to 500 μg of proteins was concentrated by TCA (10%, v/v) precipitation. Proteins were harvested by centrifugation (12 000 g, 10 min, 4°C), and the protein pellet was washed several times using a mix Tris–HCl (50 mM, pH 8)–acetone (20/80: vol/vol) containing traces of bromophenol blue (used here as a pH indicator), until neutralization. Supernatants were then discarded and protein pellets were dried in air, and then resuspended in 250 μl of Destreak Rehydration Solution (GE Healthcare) containing 1% IPG buffer pH 3–10 (GE Healthcare).

2.2.2. 2-Dimensional electrophoresis (2-DE) analysis

The proteins from at least 4 animals per estuary were individually loaded on linear pH 3–10 gradient IPG strips (13 cm, GE Healthcare). IEF was performed in an Ettan IPGphor III isoelectric focusing system (GE Healthcare), using the following protocol: a 15-min step at 250 V, a 2-h step 500 V, a 1-h gradient to 1000 V, a 2.5-h gradient to 8000 V, and a final 1.5-h step at 8000 V.

After the first dimension, strips were equilibrated 15 min in an equilibration solution (2% SDS, 6 M Urea, 50 mM Tris–HCl pH 8.8, 30% glycerol (v/v), BBP) containing DTT (1%), and then 15 min in the same solution containing iodoacetamide (260 mM). The second dimension was performed in 10–15% gradient polyacrylamide gel, as described in Budin-Verneuil et al. (2007). Proteins were revealed by incubating gels in 0.1% Coomassie blue staining solution (PhastGel Blue R-350 GE Healthcare) overnight, followed by washing in a methanol–acetic acid–water (30/7/63:v/v/v) solution.

2.2.3. Electrophoregrams analyses

Gels were scanned, and image- (spot detection and matching) and statistical-analyses were performed on 4 electrophoregrams per condition, by using the Prodigy SameSpot software (Nonlinear Dynamics). Spots displaying ANOVA P-values below 0.05 and fold accumulations above 2 (as given by SameSpot) were considered as highly significant, and were then selected for further analysis. However, we also kept some spots displaying a high accumulation factor, while displaying P-values above 0.05, and some spots displaying a factor slightly lower than 2 (see the Results and discussion section).

2.2.4. Mass spectrometric analysis

Selected spots were manually excised from 2-DE gels, and proteins were in-gel trypsinolyzed as described in Budin-Verneuil et al. (2007). Briefly, gel pieces were first washed in 50 mM ammonium bicarbonate (BICAM), and then dehydrated in 100% acetonitrile (ACN). Gel pieces were vacuum dried, and rehydrated with BICAM containing 0.5 μg trypsin (Promega), and incubated overnight at 37°C . Peptides were extracted from the gels by alternative washing with 50 mM BICAM and ACN, and with 5% formic acid and ACN. Between each step, the supernatants were pooled, and finally concentrated by evaporation using a speed vac (45°C). Samples were then resuspended in TFA (0.1% in water). Peptide solutions were mixed with the α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA, 10 mg/ml of a ACN/TFA/water (60/4/36:v/v/v) solution), and spotted on a polished steel MALDI target

using the dried droplet method. Peptides were then analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight tandem mass spectrometry (MALDI TOF-TOF) in positive ion reflector mode, using an Autoflex III (Bruker Daltonics) mass spectrometer. The flexControl software (v3.0, Bruker Daltonics) was programmed to acquire successively PMF spectra and MS/MS from the dominant peaks.

2.2.5. Proteins identification

Mass spectrometric data were analyzed by using both Mascot online (Matrix Science Ltd.), and the Peaks software (Bioinformatics Solutions) for MS/MS-based identification and de novo sequencing. The search parameters allowed for one trypsin miscleavage, oxidation of methionine, carbamidomethylation of cysteine and at least 100 ppm mass accuracy. We used three different databases; a NR protein database, and 2 EST databases, which contained ESTs of vertebrates or one containing only the *Platichthys* ESTs sequenced to date. The best results were obtained with the vertebrate EST database, using the Peaks software. All sequence tags obtained were submitted to homology searches using the Blast algorithm available at www.ncbi.nlm.nih.gov.

3. Results and discussion

Organisms commonly adapt to adverse environmental conditions by expressing selective sets of proteins allowing them to modify their metabolism, in an attempt to counteract the deleterious effects of stress on cellular functions. Conversely, we could consider that the proteins expressed by an organism in a given ecosystem reflect the environmental conditions it encounters. In this study, we first developed a global proteomic approach aiming at characterizing the proteins differentially expressed in the livers of *P. flesus* juveniles fished in three European estuaries known to be contrasted in the nature and extent of pollutions they harbor.

3.1. Characterization of proteins differentially expressed in juveniles of *P. flesus* from the Canche-, the Seine-, and the Tamar-estuaries

Proteins were separated by 2-DE gel electrophoresis. Fig. 2 shows representative Coomassie Blue stained gels obtained for each condition. At least 500 spots were detected in each gel. We performed quantitative comparison of electrophoregrams using the SameSpot software. We first considered spots as highly significant the spots displaying a P-value lower than 0.05 and/or a differential accumulation factor higher than 2, leading to the selection of 9 protein spots (Table 1). However, we considered 18 additional spots, among which 13 displayed high

accumulation factors, but P-values above 0.05, and 5 displayed factors slightly lower than 2 (between 1.6 and 1.9), but appeared clearly deregulated on gels and displayed low P-values. The high P-values observed for some spots resulted from discrepancies between replicate gels from individuals collected in the same estuary, thus most probably from the biological inter-individual variation. Some of these spots revealed to be highly increased in one individual, whereas absent or almost absent in other ones. For example, the abundance of spot T1 increased 2.6-fold (Fig. 4C, Table 1) in individuals from the Tamar, but was in fact observable only in two of the four electrophoregrams. As a consequence, its P-value was relatively high (i.e., 0.112). Two-dimensional electrophoresis should be considered as a very powerful approach to evaluate at a global scale, without a priori, the cell physiology of fishes in their ecosystem. However, in such an ecological study, working on natural ecosystems and natural *P. flesus* populations, this kind of proteomic approach (technically heavy) should be considered as exploratory. Thus, we decided not to exclude these spots from the study, considering that such accumulation patterns may reflect a particular metabolism in some individuals of a given estuary, even if it is not observable in all of the studied individuals.

Several spots revealed to be more abundant in one or two of the three estuaries (Figs. 2 and 3). For example, considering only the spots giving a P-value lower than 0.05, 2 spots were clearly more abundant in the Canche extracts (conversely, it could mean that these spots were down-accumulated both in the Tamar- and in the Seine-extracts, as compared to the Canche). In the same way, 3 spots revealed to be more abundant in fishes from the Seine and 4 in fishes from the Tamar, including 1 spot found to be accumulated in both conditions, as compared to fishes from the Canche.

Juveniles of *P. flesus* (0+) were all caught during autumn in three European estuaries located in the same hydroclimatic area (the Channel) that displays heavy currents (and thus a good oxygenation rate). The three estuaries are known to display strong differences in pollution nature and extent. Indeed, the Canche is often considered as a pristine estuary (Amara et al., 2009), whereas the Seine and the Tamar are highly polluted, by a heavy diffuse industrial and agricultural pollution (PAHs, PCBs, metals), and an old metal contamination from mine exploitation, respectively (Cachot et al., 2006; Dauvin, 2008; Durou et al., 2007; Mighanetara et al., 2009).

The differential protein spots could be considered as the proteomic signature of the environmental conditions encountered by *P. flesus* in the different estuaries. Considering the different pollutions described above, one could assume that the proteomic signatures of the three estuaries should in fact reflect their chemical signatures. In such a

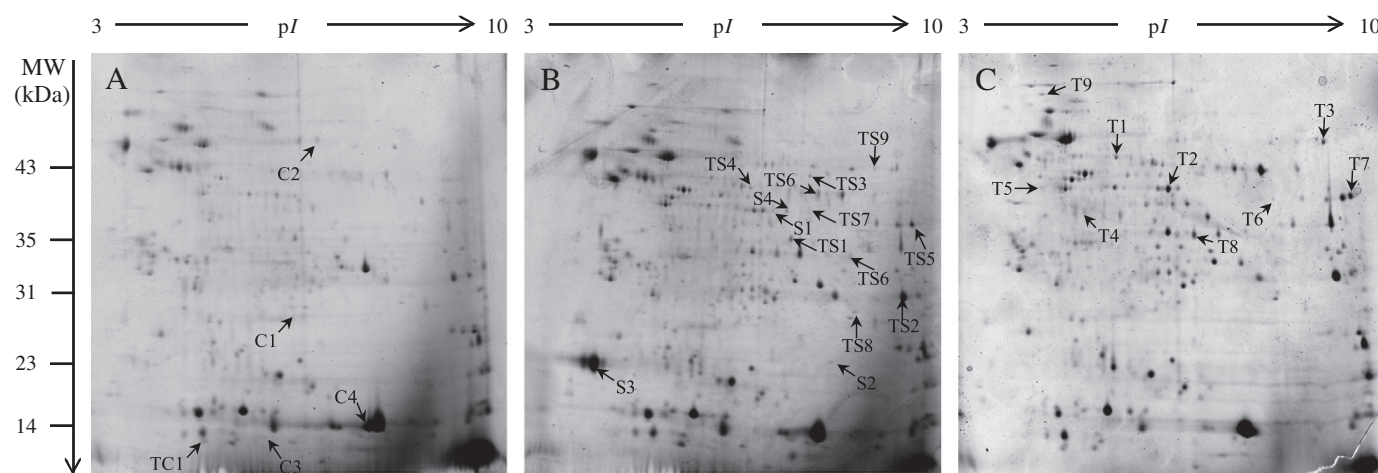


Fig. 2. Representative 2-DE gels of hepatic proteins in the flounder *Platichthys flesus* from 3 different estuaries. (A) the Canche, (B) the Seine, and (C) the Tamar. The protein spots differentially expressed in each estuary are labeled with numbers. The molecular weights (MW) and pI scales are indicated. Each gel is representative of four independent replicates.

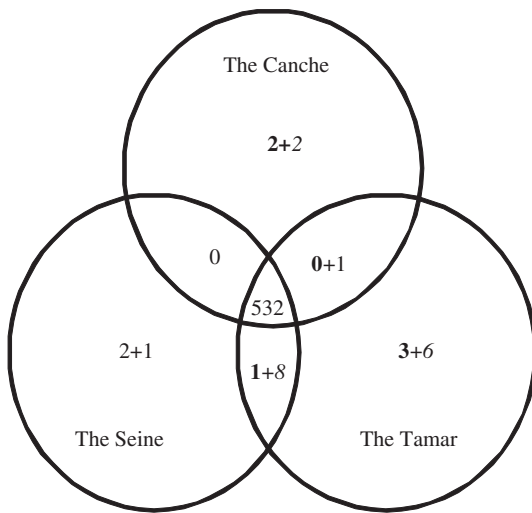


Fig. 3. Number of spots differentially accumulated in each estuary. Numbers in bold correspond to spots which level increased more than 2 times, with a P-value < 0.05. Numbers in italic correspond to spots displaying high inter-individual differences (P-value > 0.05) or accumulation factor < 2.

hypothesis, the protein spots overrepresented in the livers of flounders from both the Seine- and the Tamar-estuaries (TS spots, Table 2) should then be related to the need of these fishes to adapt to environmental pollutions encountered in both ecosystems. Similarly, protein spots specifically found in liver proteomes of *P. flesus* from the Seine— (S spots) and the Tamar— (T) should be related to the adaptation to the specific pollutants found in these estuaries (i.e., PAHs/PCBs and metals, respectively). Conversely, the protein spots overrepresented in the Canche's extracts (C spots) should correspond to proteins particularly sensitive to pollutants.

However, it should be kept in mind that in such an ecological study (we work on wild populations, in natural environments), the liver proteome is not only impacted by the nature and extent of chemical contamination of estuaries but is also dependent upon many other confounding factors, such as natural life history traits, salinity variations, temperature, food availability, the type of sediments, ... To further characterize the proteomic signatures of the three estuaries in the flounder livers, it was necessary to identify the proteins contained in those specific spots.

3.2. Mass spectrometric identification of differentially expressed proteins

To further understand the specific physiology of fishes in each estuary, the protein spots were subjected to trypsin degradation and analyzed by MALDI TOF–TOF mass spectrometry. We could obtain MS–MS data for most of them, compare these data to EST databases (vertebrate- and *P. flesus*-databases) using the PEAKS software, and finally succeed in identifying 6 of them (Table 2).

3 spots deregulated in *P. flesus* protein extracts from both the Seine and the Tamar could be identified. The TS2 spot was identified as a Glutathione S-transferase (GST) belonging to the rho-class, a class described only so far in teleost fishes (Konishi et al., 2005). GSTs are known to participate in the defense of organisms against oxidative stress, and play a major role in the detoxification of many xenobiotic compounds. Indeed, these enzymes catalyze the conjugation of the tripeptide glutathione to electrophilic parts of a wide range of xenobiotic compounds (Salinas and Wong, 1999), producing compounds that are generally less reactive and more soluble (phase II metabolism, Martinez-Lara et al., 2002). The activity of GST is often used as an indicator in experimental- and environmental-ecotoxicological studies (Fonseca et al., 2011; Kerambrun et al., 2011). In several estuarine fishes, including flounder, the GST activity was shown to correlate

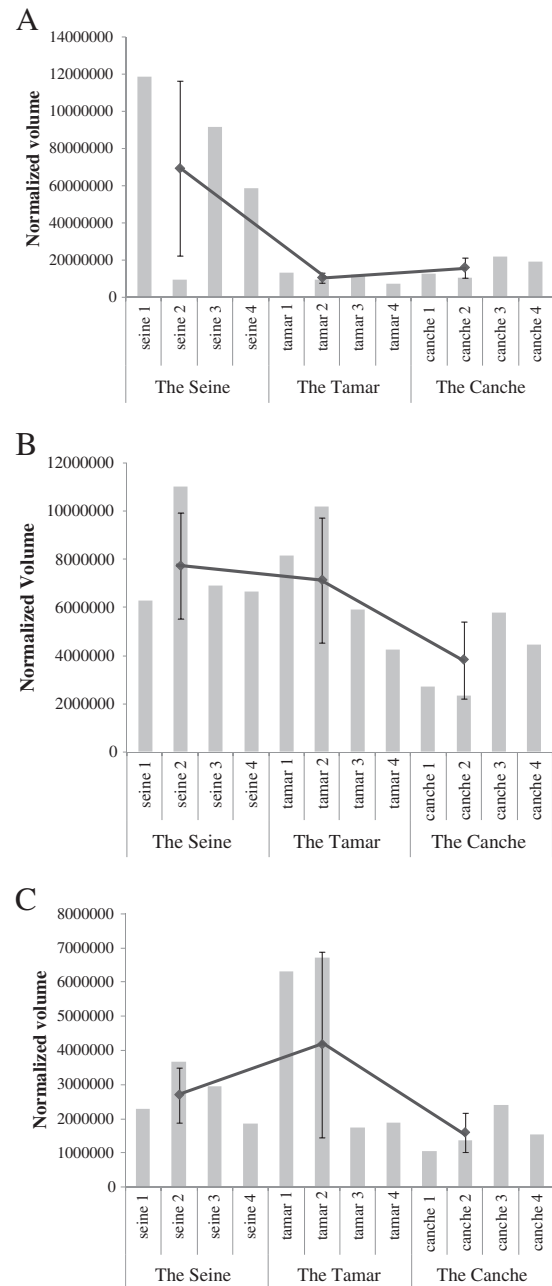


Fig. 4. Examples of typical accumulation patterns of selected spots in each estuary. A) spot S3 B) spot TS1 C) Spot T1. Points represent the mean average normalized volume of each spot ± SD. Histograms represent the normalized volumes of each spots on each 4 gels per group.

with PAH-, PCB-, and metal-environmental contaminations (Kerambrun et al., 2011; Napierska and Podolska, 2008; Napierska et al., 2006; Vieira et al., 2009).

Two protein spots corresponding to energetic metabolism enzymes, i.e. the malate dehydrogenase (TS1, MDH), a protein implied in the citric acid cycle, and the fructose biphosphate aldolase (TS5), appeared to be also overproduced in the two polluted estuaries (i.e., Seine and Tamar). Interestingly, the α -enolase (T1), also implied in glycolysis, also appeared to be more abundant in the Tamar. These results suggest an increase of the overall energy demand in fishes subjected to polluted environments, that would result from the need to adapt to environmental constraints (including pollution and/or other stressing condition specific to the life in these estuaries). It should be noted that the calculated condition indexes of the fishes from the

Table 2
Differentially accumulated spots.

Estuary	Spot number	Fold	P-value
Tamar + Seine	TS1	2.0	0.035
	TS2	2.0	0.181
	TS3	2.2	0.234
	TS4	1.8	0.019
	TS5	2.4	0.800
	TS6	2.1	0.162
	TS7	3.8	0.088
	TS8	2.6	0.155
	TS9	2.4	0.443
Canche	C1	2.6	0.043
	C2	2.0	0.008
	C3	1.7	0.041
	C4	2.3	0.152
Seine	S1	2.5	0.048
	S2	2.4	0.047
	S3	6.7	0.029
	S4	2.4	0.076
	T1	2.6	0.116
Tamar	T2	2.2	0.020
	T3	3.4	0.133
	T4	1.6	0.026
	T5	2.1	0.084
	T6	2.1	0.013
	T8	1.9	0.006
	T9	2.2	0.046
	T10	2.3	0.678
	TC1	1.7	0.042
Tamar + Canche			

Data result from the SameSpot analysis of four 2-DE gels per condition. Results in bold correspond to spots which level increased more than 2 times, with a P-value < 0.05. Results in italic correspond to spots displaying high inter-individual differences (P-value > 0.05) or accumulation factor < 2.

Canche was 1.72 ± 0.06 , and 1.7 ± 0.08 and 1.49 ± 0.04 for fishes from the Seine and the Tamar, respectively. This suggests that the increase in energy metabolism observed in individuals from the Seine and the Tamar does not serve for growth and development, thus suggesting energy reallocation toward adaptation to the particular environmental conditions encountered by these fishes.

The last identified spot (S3 – Fig. 2–Table 3) corresponded to a fertilization envelope outer layer protein-like, which belongs to the VMO-I superfamily (Vitelline Membrane Outer layer protein 1 homolog). This protein appeared to be highly accumulated in the livers of fishes from the Seine. VMO-I is an egg soluble protein expressed in the hen oviduct (Uyeda et al., 1994) that interacts with ovomucin to constitute the outer layer of the vitelline membrane (Kido and Doi, 1988). Vitellogenin (VTG) production is commonly used as a biomarker of exposure to estrogens and to xenobiotics displaying affinity for the estrogenic receptor, including PCBs and PAHs (van der Oost et al., 2003). VTG revealed to be highly induced not only in *P. flesus*

experimentally exposed to 17- β estradiol (Williams et al., 2007), but also in wild fishes from several UK estuaries, most probably resulting from the presence of endocrine disrupting compounds (Allen et al., 1999; Kleinkauf et al., 2004; Scott et al., 2006). We did not identify VTG in our study. However, it should be noted that, during fish oogenesis, the production of vitelline envelope proteins (especially zona radiata proteins) precedes that of vitellogenin (Arukwe and Goksoyr, 2003). Therefore, our results suggest that the flounders from the Seine, although immature (O+ group), initiated oogenesis. This could be due to the presence of endocrine disruptors in the Seine, that could activate an early maturation of the flounders. Interestingly, a significant proportion of intersex was previously reported in male flounders from the Seine (Minier et al., 2000). Further experiments will be of particular interest to formally correlate the presence of this protein to the initiation of the ovarian development in *P. flesus* juveniles, and to determine whether this is linked to the pollution specifically found in the Seine.

Finally, over the 27 selected proteins, we could identify only 6 of them. Considering the data available in the literature, the rate of success in protein identification from non model fishes is highly variable (Forné et al., 2010). It should be noted that, for most of the unidentified proteins, we obtained good quality MS/MS spectra. Considering how MS–MS software such as Mascot and Peaks do work, the identification success mainly depends on (i) the availability of protein/genomic sequences in databases, and on (ii) the degree of conservation of the protein. This suggests that the yet unidentified proteins should be original ones (i.e., which sequences are not yet available in databases), and thus could be of primary interest. Further progresses in the knowledge of flatfishes' genomics will certainly help, in the coming years, to improve the identification rate of proteins, and thus the overall interest of proteomic studies for this kind of experimental approaches.

4. Concluding remarks

P. flesus is often used as a sentinel species to monitor estuarine water quality. Several recent studies dealing with stress adaptation of this species used a wide transcriptomic approach, based on a 13,270-clones cDNA microarray, developed in the context of the EU-GENIPOL project (Williams et al., 2006). These transcriptomic studies were effective to characterize the responses not only of flounder to model toxicants in contamination experiments (Williams et al., 2006, 2007, 2008), but also of mesocosms- (Leaver et al., 2010) and environmentally sampled-fishes (Falciani et al., 2008; Larsen et al., 2008). Recently, Williams et al. (2011) integrated transcriptomic, metabolomic and phenotypic data to study wild *P. flesus* populations sampled at 7 estuaries displaying different degrees and profiles of chemical contaminants, and identified molecular networks associated with fishes' environmental exposure. Proteomics is highly complementary to transcriptomic analysis, as (i) proteins are direct effectors

Table 3
Identification of proteins differentially accumulated in the livers of *P. flesus* from the three estuaries.

Spot no.	Identification	Species	NCBI accession no.	Sequenced peptides	Coverage (%)	Score (%)	MW obs/th (kDa)	pI obs
TS1	Malate dehydrogenase 1a, NAD (soluble)	<i>Danio rerio</i>	gi 237850666	VVDGLSINDFSR	9.2	60.8	34/33	7.8
TS2	Glutathione S-transferase rho class	<i>Platichthys flesus</i>	gi 78229130	LWEEYLQK FGLSEERYPK DM(+15)TLLWGSPPC(+57)WR	14.4	38.9	30/24	9.4
TS5	Fructose-bisphosphate aldolase B	<i>Oryzias latipes</i>	gi 187457650	ISDGC(+57)PSALAIANANVLAR	23.5	60.8	38/39	9.6
C4	Beta hemoglobin A	<i>Seriola quinqueradiata</i>	gi 285278803	LHVDPDNFR FLSVVVSALGR IDVGEIGPQALTR	18.0	84.2	13/16	7.7
T1	Alpha enolase	<i>Black bear</i>	gi 282756065	AAVPSGASTGIYEALRL	23.5	21.7	43/47	5.9
S3	VMO-1 superfamily protein	<i>Platichthys flesus</i>	gi 109176266	GDDTTANNIR M(+16)EDQQGGDDTALNDVR	24.6	70.0	23/23	4.6

Proteins were excised from the 2-DE gels, trypsinolyzed, and the resulting peptides were sequenced by using MALDI TOF–TOF mass spectrometry. Spectra analysis was performed using the PEAKS Software. The score and the coverage were those given by the PEAKS software, using the search parameters described in the Materials and methods section.

of the actual cellular and organism physiology (Tomanek, 2011), and (ii) it is acknowledged that transcriptomic data explains less than half of the variations in protein abundances (Feder and Walser, 2005). Proteomics was also considered in the GENIPOL project and was presented in several meeting abstract (George et al., 2003; MacKenzie et al., 2008; Rogowska-Wrzesinska et al., 2003, 2006) but, to our knowledge, never published as full papers.

In our study, we characterized several proteins differentially accumulated in the livers of flounder collected in 3 estuaries that notably differ in the nature and extent of pollution they carry. The obtained results suggest that *P. flesus* individuals collected in polluted areas (i) increase their energetic metabolism-, and (ii) use Glutathione-S-transferase-, to counteract the deleterious effects of pollution. In addition, we showed a strong accumulation of a protein belonging to the VMO-I superfamily in individuals from the Seine, that could be related to the presence of endocrine disrupters in this site. However, it should be kept in mind that working on wild populations, in natural environments, raises questions about the actual link between the observed proteome phenotypes and the nature and extent of chemical contamination of estuaries. Indeed, the measured molecular response will obviously be also dependent upon natural life history traits, and to other environmental factors such as salinity variations, temperature, food availability, the type of sediments, or other confounding factors. As a consequence, this kind of proteomic strategy should be considered as exploratory, and we are now (i) characterizing the effects of experimental contaminations on flounder liver proteome, and (ii) studying the physiology of fishes in both experimentally- and naturally-polluted environments. The combination of these experimental approaches will help us in understanding the adaptation mechanisms of *P. flesus* to estuarine pollutions, and will hopefully lead to the development of new molecular biomarker to monitor the quality of estuarine water.

Acknowledgments

We thank Mehdi Taiya (MS platform, UBO) for his help. This work is part of – , and is funded by – the European Interreg IVa France (Channel)/England program, and the French ONEMA (office national de l'eau et des milieux aquatiques).

References

- Able, K.W., 2005. A re-examination of fish estuarine dependence: evidence for connectivity between estuarine and ocean habitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 64, 5–17.
- Allen, Y., Scott, A.P., Matthiessen, P., Haworth, S., Thain, J.E., Feist, S., 1999. Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1791–1800.
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., Minier, C., 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia* 627, 87–98.
- Arukwe, A., Goksoyr, A., 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology* 2, 1–21.
- Budin-Verneuil, A., Pichereau, V., Auffray, Y., Ehrlich, D., Maguin, E., 2007. Proteome phenotyping of acid stress-resistant mutants of *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics* 7, 2038–2046.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 257–267.
- Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., van den Belt, M., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260.
- Courrat, A., Lobry, J., Nicolas, D., Laffargue, P., Amara, R., Lepage, M., Girardin, M., Le Pape, O., 2009. Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 81, 179–190.
- Dando, P.R., 2011. Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Marine Ecology Progress Series* 430, 183–196.
- Dauvin, J.-C., 2008. Effects of heavy metal contamination on the macrobenthic fauna in estuaries: the case of the Seine estuary. *Marine Pollution Bulletin* 57, 160–169.
- Durou, C., Poirier, L., Amiard, J.-C., Budzinski, H., Gnassia-Barelli, M., Lemenach, K., Peluhet, L., Mouneyrac, C., Roméo, M., Amiard-Triquet, C., 2007. Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution* 148, 445–458.
- Evrard, E., Marchand, J., Theron, M., Pichavant-Raffini, K., Durand, G., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 152, 321–331.
- Falciani, F., Diab, A.M., Sabine, V., Williams, T.D., Ortega, F., George, S.G., Chipman, J.K., 2008. Hepatic transcriptomic profiles of European flounder (*Platichthys flesus*) from field sites and computational approaches to predict site from stress gene responses following exposure to model toxicants. *Aquatic Toxicology* 90, 92–101.
- Feder, M.E., Walser, J.C., 2005. The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses. *Journal of Evolutionary Biology* 18, 901–910.
- Fonseca, V.F., Franc, S., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquatic Toxicology* 102, 216–227.
- Forné, I., Abián, J., Cerdà, J., 2010. Fish proteome analysis: model organisms and non-sequenced species. *Proteomics* 10, 858–872.
- George, S., Chipman, K., Fey, S., Mose-Larsen, P., Tom, M., 2003. A genomic and proteomic approach to develop toxicologically predictive gene sets for assessment of fish health in polluted environments. 22nd ESCP meeting, Biological effects of pollutants: The role of environmental proteomics and genomics. Alessandria, Italy.
- Hemmer-Hansen, J., Nielsen, E.E., Gronkjaer, P., Loeschcke, V., 2007. Evolutionary mechanisms shaping the genetic population structure of marine fishes; lessons from the European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Molecular Ecology* 16, 3104–3118.
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, F., Amara, R., 2011. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? *Comparative Biochemistry and Physiology. C* 154, 187–195.
- Kido, S., Doi, Y., 1988. Separation and properties of the inner and outer layers of the vitelline membrane of hen's egg. *Poultry Science* 67, 476–486.
- Kleinkauf, A., Scott, A.P., Stewart, C., Simpson, M.G., Leah, R.T., 2004. Abnormally elevated VTG levels in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK) – a continuing problem. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58, 356–364.
- Konishi, T., Kato, K., Araki, T., Shiraki, K., Takagi, M., Tamaru, Y., 2005. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Biochemical Journal* 388, 299–307.
- Larsen, P.F., Nielsen, E.E., Williams, T.D., Hemmer-Hansen, J., Chipman, J.K., Kruhoffer, M., Gronkjaer, P., George, S.G., Dyrsjot, L., Loeschcke, V., 2007. Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). *Molecular Ecology* 16, 4674–4683.
- Larsen, P.F., Nielsen, E.E., Williams, T.D., Loeschcke, V., 2008. Intraspecific variation in expression of candidate genes for osmoregulation, heme biosynthesis and stress resistance suggests local adaptation in European flounder (*Platichthys flesus*). *Hereditas* 101, 247–259.
- Leaver, M.J., Diaba, A., Boukouvala, E., Williams, T.D., Chipman, J.K., Moffat, C.F., Robinson, C.D., George, S.G., 2010. Hepatic gene expression in flounder chronically exposed to multiply polluted estuarine sediment: Absence of classical exposure 'biomarker' signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways. *Aquatic Toxicology* 96, 234–245.
- Lyons, B.P., Thain, J.E., Stentiford, G.D., Hylland, K., Davies, I.M., Vethaak, A.D., 2010. Using biological effects tools to define good environmental status under the European Union Marine Strategy Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1647–1651.
- MacKenzie, C., Rogowska-Wrzesinska, A., George, S., 2008. Proteomic analysis of pollutant effects in European flounders using DIGE. *Marine Environmental Research* 66, 101.
- Marchand, J., Evrard, E., Guinand, B., Cachot, J., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic coast. *Marine Environmental Research* 70, 201–209.
- Martinez-Lara, E., Leaver, M., George, S., 2002. Evidence from heterologous expression of glutathione S-transferase A and A1 of the plice (*Pleuronectes platessa*) that their endogenous role is in detoxification of lipid peroxidation products. *Marine Environmental Research* 54, 263–266.
- Mighanetara, K., Braungardt, C., Rieuwerts, J., Azizi, F., 2009. Contaminant fluxes from point and diffuse sources from abandoned mines in the River Tamar catchment, UK. *Journal of Geochemical Exploration* 100, 116–124.
- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquené, G., Godefroy, D., Burgeot, T., Le Boulenger, F., 2000. Flounder health status in the Seine Bay: a multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50, 373–377.
- Napierska, D., Podolska, M., 2008. Relationship between biomarker responses and contaminant concentration in selected tissues of flounder (*Platichthys flesus*) from Polish coastal area of the Baltic Sea. *Oceanologia* 50, 421–442.
- Napierska, D., Kopecka, J., Podolska, M., Pempkowiak, J., 2006. Hepatic glutathione S-transferase activity in flounder collected from contaminated and reference sites along the Polish coast. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65, 355–363.
- Rogowska-Wrzesinska, A., Fey, S.J., George, S., Mose-Larsen, P., 2003. Proteomic analysis of pollutant responses in European flounders: methodological development and preliminary analysis of effects of estuarine pollution. 12th International Symposium Pollutant Responses In Marine Organisms, Tampa, Florida, USA.
- Rogowska-Wrzesinska, A., George, S., Sabine, V., Mose-Larsen, P., Fey, S.J., 2006. Proteomic analysis of European flounder: methodological outline and analysis of effects of pollution. *Marine Environmental Research* 62, 157–158.
- Salinas, A.E., Wong, M.G., 1999. Glutathione S-transferases: a review. *Current Medicinal Chemistry* 6, 279–309.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N., 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15, 333–340.

- Schnitzler, J.G., Thomé, J.P., Lepage, M., Das, K., 2011. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and trace elements in wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) off European estuaries. *Sciences of The Total Environment* 409, 3680–3686.
- Scott, A.P., Katsiadaki, I., Kirby, M.F., Thain, J., 2006. Relationship between sex steroid and vitellogenin concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) sampled from an estuary contaminated with estrogenic endocrine-disrupting compounds. *Environmental Health Perspectives* 114, 27–31.
- Skerritt, D.J., 2010. A review of the European flounder *Platichthys flesus* — biology, life history and trends in population. Eastern Sea Fisheries Joint Committee report. Newcastle University. 13 pp. (available at , www.esfjc.co.uk).
- Tomanek, L., 2011. Environmental proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis, and development. *Annual Reviews of Marine Science* 3, 373–399.
- Uyeda, A., Inuzuka, C., Doi, Y., Kido, S., Kikuchi, M., 1994. Cloning and sequencing of hen magnum cDNAs encoding vitelline membrane outer layer protein I (VMO-I). *Gene* 144, 311–312.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149.
- Vasconcelos, R.P., Reis-Santos, P., Costa, M.J., Cabral, H.N., 2011. Connectivity between estuaries and marine environment: Integrating metrics to assess estuarine nursery function. *Ecological Indicators* 11, 1123–1133.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76, 1416–1427.
- Williams, T.D., Diab, A.M., George, S.G., Godfrey, R.E., Sabine, V., Conesa, A., Minchin, S.D., Watts, P.C., Chipman, J.K., 2006. Development of the GENIPOL European flounder (*Platichthys flesus*) microarray and determination of temporal transcriptional responses to cadmium at low dose. *Environmental Science & Technology* 40, 6479–6488.
- Williams, T.D., Diab, A.M., George, S.G., Sabine, V., Chipman, J.K., 2007. Gene expression responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to 17-beta estradiol. *Toxicology Letters* 168, 236–248.
- Williams, T.D., Diab, A., Ortega, F., Sabine, V.S., Godfrey, R.E., Falciani, F., Chipman, J.K., George, S.G., 2008. Transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to model toxicants. *Aquatic Toxicology* 90, 83–91.
- Williams, T.D., Turan, N., Diab, A.M., Wu, H.F., Mackenzie, C., Bartie, K.L., Hrydziusko, O., Lyons, B.P., Stentiford, G.D., Herbert, J.M., Abraham, J.K., Katsiadaki, I., Leaver, M.J., Taggart, J.B., George, S.G., Viant, M.R., Chipman, K.J., Falciani, F., 2011. Towards a system level understanding of non-model organisms sampled from the environment: a network biology approach. *PLoS Computational Biology* 7, e1002126.

Article 5 : Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the British Channel, considering biomarkers and life history traits



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul

Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits

Célie Dupuy^{a,b,*}, Claire Galland^a, Vianney Pichereau^a, Wilfried Sanchez^c, Ricardo Riso^a, Maylis Labonne^{a,d}, Rachid Amara^e, Grégory Charrier^a, Michel Fournier^b, Jean Laroche^a

^a Université Européenne de Bretagne, Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin LEMAR, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

^b Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier (INRS-IAF), 31 Boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada

^c Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Pôle "Dangers et impact sur le vivant", Unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo, Parc Technologique ALATA, 60550 Verneuil en Halatte, France

^d Centre IRD de Bretagne, BP 70, 29280 Plouzané, France

^e Université Lille Nord de France, ULCO LOG, CNRS UMR 8187, F-62930 Wimereux, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online xxx

Keywords:

Pollution
Estuaries
Fish
Immunotoxicity
Gene expression
Life-history traits

ABSTRACT

A multi-biomarker approach was developed to evaluate responses of European flounder (*Platichthys flesus*) in three contrasted estuaries over the English Channel: the Canche (pristine site), Tamar (heavy metals and PAHs contamination) and Seine (heavily pollution with a complex cocktail of contaminants). The condition factor and several biomarkers of the immune system, antioxidant enzymes, energetic metabolism and detoxification processes were investigated in young-of-the-year (0+) and one-year-old (1+) flounder. Results underlined the difference between the pristine site and the Seine estuary which showed a lower condition factor, a modulation of the immune system, a higher Cytochrome C oxidase activity, and an up-regulation of BHMT expression. The moderate biomarker responses in the Tamar fish could be linked to the specific contamination context of this estuary. Flounder life history traits were analyzed by otolith microchemistry, in order to depict how the fish use their habitat and thus respond to chemical stress in estuaries.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Coastal systems like bays or estuaries are essential nursery areas for juvenile fish displaying high densities and pronounced growth rates (Beck et al., 2001). These environments are characterized by a high potential of fish production (Dolbeth et al., 2008), and are considered as essential ecosystems for the renewal of fisheries resources, since many commercially important marine species use estuaries as nurseries during juvenile stages (Cowley and Whitfield, 2002; Houde and Rutherford, 1993; Lamberth and Turpie, 2003). The quality of these coastal nurseries is crucial for fish early life-stages (Florin et al., 2009), and is linked to complex interactions between biotic factors (i.e. population density, inter-specific competition) and abiotic parameters (i.e. temperature, salinity, dissolved oxygen, sediment nature, food availability) (Ramos et al., 2009; Yamashita et al., 2001). Nevertheless, estuaries

are also strongly impacted by human activities and display frequently high levels of xenobiotics in water and sediments (Courrat et al., 2009). Flatfish are particularly sensitive to the effects of pollution, since benthic species are tightly linked to sediments that are frequently contaminated by complex mixtures of toxic substances (Johnson et al., 1998). In the present study, responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to contaminants were investigated in three estuaries in the English Channel. *P. flesus* is considered as a pertinent sentinel species for assessing water quality in Europe (Kerambrun et al., 2013; Laroche et al., 2013; Williams et al., 2011). Moreover, juvenile European flounder stay two or three years in estuaries before reaching sexual maturity (Skerritt, 2010; Stevens et al., 2006), thus showing an increase in cellular damage, energetic request and detoxification rate related to the increasing exposure time to stress in polluted estuaries (Evrard et al., 2013).

In the present study, fish responses were compared in three contrasted estuaries over the English Channel: the Tamar in England and the Seine and Canche in France. Hagger et al. (2008) compared responses of *Mytilus edulis* in several estuaries along

* Corresponding author at: LEMAR UMR 6539, IUEM, Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France. Tel.: +33 2 98 22 45 34.

E-mail address: cel.e@hotmail.fr (C. Dupuy).

the South-West coast of England, and considered that the Tamar estuary is a site at risk: mussels displayed in this system low phagocytosis activity, high lysosomal damage and low acetylcholinesterase activity. Mining impacted the Tamar for at least nine centuries (Langston et al., 2003), and thus high loads of tin, copper, lead, silver, iron, arsenic, zinc, tungsten and manganese might be particularly present in the sediments. Furthermore, several studies have detected in the Tamar significant concentrations of PAHs in surface sediments as in mussel tissue, which were probably sufficiently high to affect marine organisms (Woodhead et al., 1999; Shaw et al., 2011). The Canche estuary is considered as a pristine site (Amara et al., 2007, 2009; Gilliers et al., 2004): concentrations in heavy metals and PAHs are lower in Canche sediments than in Seine sediments. Furthermore, fish display a higher condition index and a better growth rate in the Canche than in the Seine (Amara et al., 2007, 2009; Kerambrun et al., 2013). The Seine estuary undergoes a diffuse contamination (complex mixture of chemicals: heavy metals, PCBs, PAHs, etc.) that is similar to levels reported in heavily polluted North-American estuaries (Munsch et al., 1996). Thus, this high pollution level in the Seine can induce high EROD activity (Minier et al., 2000) and reduced fecundity (Marchand et al., 2004) in the local flounder population.

A population genetics study was recently conducted in European flounder, considering the three sites included in the present study (Tamar, Canche and Seine) and other southern estuaries along the Atlantic coast (Calvès et al., 2013). Analysis of the polymorphism at a candidate gene involved in the energetic metabolism, the AMP-desaminase isoform 1 (AMPD1), underlined a higher heterozygosity in the most polluted populations (Seine, Tamar) and a significant genetic differentiation of these two polluted sites from the other populations, including the Canche. Finally, this population genetics study suggested that cocktails of pollutants may act directly or indirectly as selective agents on the AMPD1 gene in chronically contaminated flounder populations from the English Channel. Comparisons of liver proteomes between European flounder from the above-mentioned estuaries in the English Channel confirmed also that the Seine and Tamar display common trends which differentiate them from the Canche, i.e. an increase of the energetic metabolism, oxidative stress and detoxification process, which might be related to the high level of chemical stress in these two polluted estuaries (Galland et al., 2013).

Considering the pertinence of European flounder as a sentinel species, and the previous genetics and proteomics approaches conducted on this species over the English Channel, the main objective of the present study consisted in improving our knowledge about the impact of chemical stress on flounder, by analyzing molecular, cellular and biochemical biomarkers as well as life-history traits in the three estuaries (Tamar, Canche, Seine).

Fish immune responses were explored by measuring the phagocytosis capacity of anterior kidney cells and by assessing gene expression level of the complement component C3 (C3) and the tumor necrosis factor receptor (TNF-R) in the liver. TNF-R is a protein of the TNF system, which is implicated in apoptosis and cellular necrosis (Smith et al., 1994). Moreover, the TNF system and complement are involved in inflammatory responses (Bayne et al., 2001; Wang et al., 2012; Watts et al., 2001). C3 is the central protein of the complement system which is implicated in the modulation of phagocytosis, lysis of cells and inflammatory response (Boshra et al., 2006; Qi et al., 2011; Ye et al., 2011). Gene expression levels of the Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and betaine homocysteine S-methyltransferase (BHMT) were also assessed in the liver, since CYP1A1 plays a major role in biotransformation of many xenobiotics in fish (Sarasquete and Segner, 2000) and BHMT is involved in fish detoxification process and/or oxidative stress response (Evrard et al., 2010a; Marchand et al., 2006). The activity

of two antioxidant enzymes implicated in the oxidative stress response was also evaluated: the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Lastly, the Cytochrome C oxidase (CCO) enzymatic activity was measured, since CCO is the complex IV of the electron transport chain of the mitochondria, and thus could be considered as a potential proxy of the fish metabolic capacity (Cohen et al., 2005; Pelletier et al., 1994).

Measures of condition factor and growth rate were considered as global indicators of fish health status. The recent growth rate was determined by measuring the average width of daily increments on the otoliths. Furthermore Sr:Ca otolith signatures were analyzed to track migration patterns along the salinity gradient; the general assumption was that the concentration in Sr is higher in seawater than in estuaries or freshwater environments (Morais et al., 2011). Otolith microchemistry is an efficient tool to diagnose possible different life-history patterns among *P. flesus* individuals or populations, and particularly distinct abilities to exploit brackish and/or freshwater habitats (Daverat et al., 2012). As a result of such variability in life-history, fish could be exposed to contrasted environmental contexts which may modulate their responses to chemical stress in estuaries.

2. Materials and methods

2.1. Fish sampling and cell preparation

Juveniles stemming from the 0+ and 1+ cohorts (average length in Table 1) were collected with a beam-trawl in September–October 2009 and 2010, in three estuaries over the Channel (Fig. 1): the Canche ($n = 30$, in 2009 and 2010), the Tamar ($n = 30$ in 2009) and the Seine ($n = 30$ in 2009; $n = 34$ in 2010). Fish were killed by cervical dislocation, immediately after capture. Total length and total and gutted-carcass weight were measured for each individual sample. The liver and a sample of muscle were flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Otoliths were sampled for age determination.

The head kidney of each fish was aseptically collected. Pronephric cell suspensions were obtained by homogenization of the head kidney with a syringe valve against a steel grid with 1 ml of medium. The medium used throughout the assays consisted of steril RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Biomedica, Montréal, Canada), 0.5 mg/mL sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin (100 mg/mL), and buffered with 10 mM Hepes (pH 7.4) (Brousseau et al., 1999). Cells were counted with a hemocytometer by a microscope, using trypan blue dye exclusion (0.4%). Cell viability was over 90%.

Table 1

Average fish total length (cm) and growth index (μm) \pm SD, of the 0+ and 1+ cohorts in the Canche (C), Seine (S) and Tamar (T).

	Total length	Growth index
2009		
CO+	10.2 \pm 1.0*	3.21 \pm 0.9
SO+	13.5 \pm 1.7	4.10 \pm 1.16
TO+	11.8 \pm 2.1	3.12 \pm 0.54
2010		
CO+	9.65 \pm 1.4	–
C1+	12.0 \pm 3.2	–
SO+	9.75 \pm 1.7#	–
S1+	17.9 \pm 3.2*	–

* Statistics: significant difference between estuaries, in the same year ($p < 0.05$).

Significant difference within the same estuary, between 2009 and 2010 ($p < 0.05$).

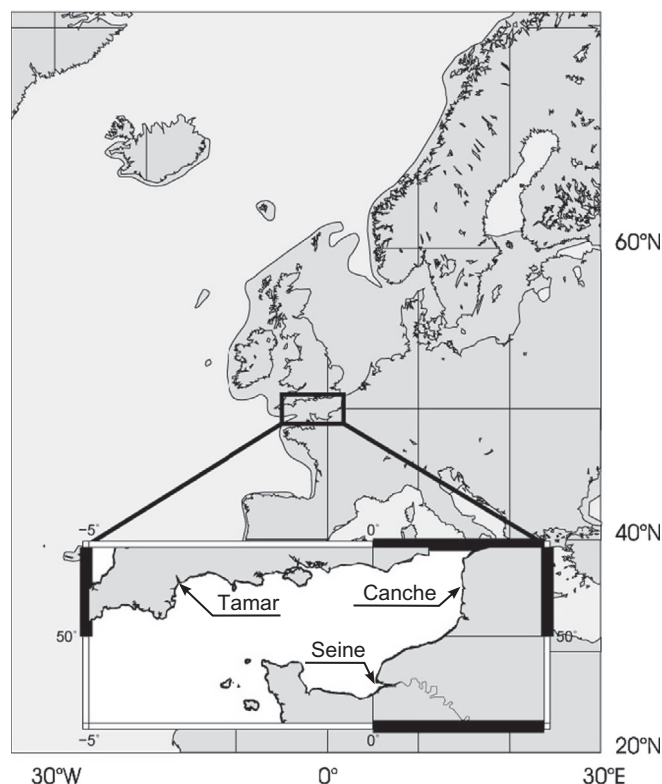


Fig. 1. The three sampling sites in the English Channel.

2.2. Phagocytosis

The capacity of phagocytosis was assessed by the method described by Brousseau et al. (1999). Briefly, fluorescent latex beads ($d = 1.7 \mu\text{m}$, Polysciences, Warrington, USA) were added to pronephric cell suspensions ($10^6 \text{ cells ml}^{-1}$) in order to respect the 100:1 beads to cell ratio. Cells were incubated 18 h at ambient temperature ($20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). Then, cell suspensions were layered over a 3% bovine serum albumin gradient, and cells were recovered by centrifugation at 150 g for 8 min in order to remove free beads. Cell pellets were resuspended in 0.5 ml of 0.5% formaldehyde and 0.2% sodium azide diluted in phosphate buffer saline (PBS); cells could be kept in this buffer during one week. Finally, cells were analyzed by flow cytometer (FACSCalibur cytometer, Becton Dickinson, San José, USA) and 10,000 events were recorded. Efficiency of phagocytosis was determined according to the percentage of cells having three or more beads in macrophage gate.

2.3. Metal analysis

For each estuary, three pools of three liver samples ($\sim 150 \text{ mg}$) were mineralized in 3 mL nitric acid (65%, Suprapur, Merck). After dilution (10 mL), concentrations of copper (Cu), lead (Pb) and cadmium (Cd) were assessed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS).

Atomic absorption measurements were performed with a Perkin–Elmer SIMAA 6100 working in the single element monochromator mode. End-capped pyrolytic coated graphite tubes equipped with integrated platforms were used, and argon was employed as inert gas. Samples were delivered to the furnace using a Perkin–Elmer AS-800 auto-sampler and stored in acid washed polypropylene cups prior to injection. Perkin–Elmer hollow cathode lamps were chosen as light sources. Calibration curves were drawn up and using standard solutions of Cu, Pb and Cd (1 g l^{-1}

in 0.5 M HNO_3 , Merck solutions), and when necessary, solutions were diluted before performing measurements. Dilutions were carried out in MilliQ water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) with calibrated Gilson Pipetman pneumatic syringes. A 2300°C atomization temperature was used for the determination of Cu, and a 1800°C atomization temperature was used for Pb and Cd. Furnace programs had been optimized in previous studies (Cabon et al., 2007; Salomon et al., 2000). No pre-treatment step was included for the determination of metals in the different solutions.

The calculated limit detection (LD) corresponds to three times the standard deviation on 11 measures made on a blanc reagent. The LD was respectively: $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ for Cu, $0.05 \mu\text{g l}^{-1}$ for Cd, and $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ for Pb.

Standard solutions of Cu, Pb and Cd (1 g l^{-1} in 0.5 M HNO_3 , Merck solutions) were used to build calibration curves. All dilutions were prepared in Milli Q water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). To test the quality control of data, the global analytical procedure was applied to the certified mussel tissue, SRM 2974 (NIST Gaithersburg, MD, USA). The recoveries for five replicates on this SRM were between 85% and 110%, with reproducibility ranging from 5% to 15% depending on the metals.

2.4. Enzymatic activities

A sample of muscle was homogenized using a bead grinder (Precellys 24, Bertin Technologies) in ice-cold phosphate buffer (100 mM, pH 7.8) supplemented with 20% (v/v) glycerol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a serine protease inhibitor. The homogenates were centrifuged for 15 min at $10,000g$ and 4°C , and the post-mitochondrial fractions were used for biochemical assays. Total protein concentrations were determined using the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin (Sigma) as a standard. Antioxydant enzymatic activities were assessed by measuring SOD and CAT concentrations according to the methods of Paoletti et al. (1986) and Babo and Vasseur (1992), respectively; assays were adapted to flounder muscle, and performed in 96-well microplates.

CCO activity was measured at 22°C using a microplate spectrophotometric assay in muscle S9 fraction (Smith and Conrad, 1956; Théron et al., 2000). Absorbance changes were monitored at 550 nm during 8 min. Protein concentrations were determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard (BIO-RAD Laboratories, USA).

2.5. Gene expression

Gene expression was measured following the protocol described by Calvès (2011). Total RNA was isolated using Trizol reagent (Applied Biosystems) at a concentration of 1 ml per 50 mg of tissue. Each liver was homogenized in Trizol using a Precellys-24 ceramic bead-based homogenizer (Bertin Technologies). Samples were treated with RTS DNase Kit (MO BIO) to prevent DNA contamination. Purity and concentration of RNA samples were determined using a NanoDrop 8000 spectrometer (Thermo Scientific). Purity was assessed using the ratio A260/A230 and A260/A280. RNA quality was assessed either using the 2100 Bioanalyzer Agilent (Agilent Technologies) or by migration on agarose gel (1.5%). For each sample, a reverse transcription (RT) was carried out using $1 \mu\text{g}$ total RNA with RevertAid H minus First Strand, cDNA Synthesis Kit® (Fermentas). In addition, a RT was carried out using a mixture of RNA samples stemming from each experimental condition. This mixture was used as a control in each run of real-time PCR.

mRNA were quantified for the four following genes: BHMT, C3, TNF-R and CYP1A1. In addition, two housekeeping genes were included in the analysis: alpha-tubulin and 18S. Primers for

CYP1A1, alpha-tubulin, 18S and BHMT were obtained in the literature (Table 2). Primers for C3 and TNF-R were designed with Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 1999), considering sequences available in Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). No significant differences in gene expression levels (i.e. similar cycle threshold values, Ct) were observed for the alpha-tubulin between the control and the contaminated fish. Furthermore the alpha-tubulin showed the lowest variation in expression levels, and thus was retained as the housekeeping gene in our analysis.

Quantitative real-time PCR (qPCR) amplifications were carried out in triplicate in 25 µl volume, containing 1 µl of cDNA (1/40 dilution), 12.5 µl of Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific), 1.75 µl of each primer (1 µM) and 8 µl of water. A negative control was carried out (each total RNA sample with DNase treatment). Each run included cDNA of sample, cDNA of mixture used as control, blank controls (water) analyzed for each primer pair and a cDNA mixture analyzed for the housekeeping gene and used to normalize the plates (and take into account variations between plates). qPCR reactions were performed in a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) with qPCR thermal cycling program as follow: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, then 40 cycles at 95 °C for 15 s followed by 1 min at 60 °C. Afterwards, the specificity of the reaction was confirmed by calculating a melting curve according to the following program: 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s followed by an increase of temperature by 0.5 °C each 15 s until 90 °C.

The qPCR efficiency (E) was determined for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of cDNA. Relative expression of the target gene was calculated with the Pfaffl formula (2001) using the alpha-tubulin as a reference gene:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control}-\text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control}-\text{sample})}}$$

The ratio of a target gene is expressed in a sample versus a control in comparison to a reference gene. E_{target} is the qPCR efficiency of the target gene transcript; E_{ref} is the qPCR efficiency of the reference gene transcript; $\Delta\text{CP}_{\text{target}}$ is the CP (crossing point threshold) deviation of control – sample of the target gene transcript; $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ is the CP deviation of control – sample of the reference gene transcript.

2.6. Condition factor, age estimation, otolith microstructure and microchemistry

The body condition factor (CF) was assessed with the formula: $\text{CF} = 100 \times W/L^3$, where W is the gutted-carcass weight (g) and L is the standard length (mm) of each fish. The age of each fish was assessed by reading otoliths with a binocular.

A significant linear relationship was observed between the sagittal otolith diameter and the fish length (Amara et al., 2009); thus, the average daily otolith increment could be considered as a proxy of the growth rate. The preparation was the same for the left otolith chosen for growth analysis and the right one used for laser

ICP-MS analysis. Otoliths were embedded in epoxy resin and cut in the transversal plan. The slice was ground by hand with 1200, 2400 abrasive paper to expose the otolith core, and then successively polished with 3 and 1 µm diamond pastes. Thin slices including the nucleus and the edge were examined under 1000× magnification. Measurement of the microincrement width was made on the ventral axis using TNPC software. Microincrements were measured in the area located between 300 and 900 µm from the nucleus, when 30 rings were consecutively readable. A significant linear relationship was detected between total fish length (TL in cm) and otolith ventral radius (VR in µm): $\text{TL} = 0.0114 (\text{VR}) + 1.0677$ ($n = 65$, $R^2 = 0.852$). The average daily growth rate per fish was assessed for a total length comprised between 5 and 11 cm, i.e. during the summer season: June–August (Amara et al., 2009; Evrard et al., 2013).

For ICP-MS analysis, embedded otoliths were set with five to seven other otoliths on geological slides with double face tape to reduce the time of analysis in the ICP-MS cell. Trace element analysis was conducted using a Thermo Element 2 ICP-MS and a 193 nm CopexPro 102 Coherent Laser. Profiles across the growth axis were depicted for each otolith from the core to the edge. Analyses were performed using a 90 µm laser beam with a repetition rate of 7 Hz, a fluency of 15 J/cm² and a speed of 3 µm/s. Chemical analyses were performed using ⁸⁶Sr and ⁴³Ca isotopes, and Ca was used as an internal standard for the quantification. An international certified material NIST 612 was used for instrument calibration, and a reference standard (MACS-1, US Geological Survey) was analyzed at the end of each session. Collected data ($n = 15$, 224 ppm ±15) were in good accordance with the range of values of the referenced material (209–249 ppm, compiled value 219 ppm, <http://georem.mpch-mainz.gwdg.de>). Since the ontogenic development can modify the Sr incorporation in the otolith (de Pontual et al., 2003), transects were interpreted after 100 µm, which corresponds to the position of the accessory primordium (i.e. beginning of the post-metamorphosis stage).

2.7. Statistical analyses

Statistical tests and box plot graphs were performed in Statistica 10.0 (StatSoft). Variables were not normally distributed, so the Kruskal–Wallis (KW) test was used for comparisons between estuaries. When the KW test was significant ($p < 0.05$), it was followed by a post hoc test: a multiple bilateral comparison test of mean ranks. Relationships between quantitative data (CF, phagocytosis, CCO, SOD, CAT and the gene expression level for C3, TNF-R, CYP1A1 and BHMT) were investigated using nonparametric tests (Pearson's correlation).

3. Results

3.1. Phagocytosis

In 2010, 0+ and 1+ cohorts displayed a significantly lower phagocytosis capacity in the Seine than in the Canche (Fig. 2). No data were available for fish from the Tamar.

Table 2
Primer sequences used to qPCR.

Genes	Forward (5'–3')	Reverse (5'–3')	Origin
α-Tubulin	CAC-AGC-CTC-ACT-TCG-TTT-TG	AGA-TGA-CAG-GGG-CAT-AGG-TG	Leaver et al. (2010)
18S	GTC-TGG-ITA-ATT-CCG-ATA-ACG-AAC-GAG-ACT-CTA	TGC-TCA-ATC-TCG-TGT-GGC-TAA-ACG-CCA-CTT-G	Evrard et al. (2010a,b)
CYP1A1	GCC-AAC-GTG-ATC-TGC-GGA-ATG	AAG-CCG-ACC-AGC-TCC-TGA-TC	Calvès (2011)
BHMT	AGA-GAG-GCC-TAC-AAG-GCT-GG	GTG-TGC-ATC-TCC-AGA-CCA-GCG-C	Evrard et al. (2010a,b)
TNF-R	CAG-CCG-AAT-CTC-AGT-GAT-GG	CAG-TTG-GAT-GCC-AAG-TCA-GC	Designed from ES443667.1
C3	ACG-ATG-AAA-GTG-GGC-GTC-TT	TGC-AGT-TCT-CTT-CGG-CAC-TT	Designed from EC379465.1

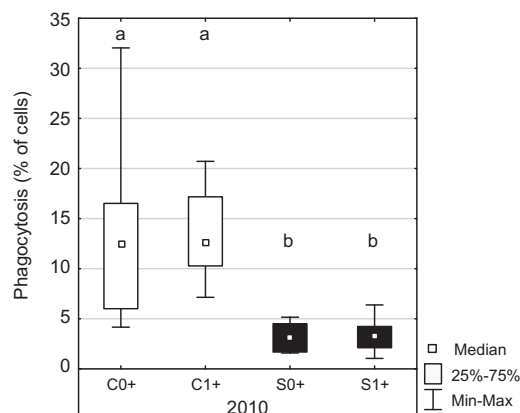


Fig. 2. Phagocytosis capacity (percentage of cells that have engulfed three beads and more) of flounders from the Canche (C) and Seine (S), considering 0+ and 1+ cohorts. (Statistics: letters indicate significant differences between populations; $P < 0.05$.)

3.2. Metal analysis

Over the three estuaries, the lowest metal concentrations in the liver (for Cu, Pb or Cd) were detected in the Canche estuary (Table 3). The concentration of Cu and Pb in fish liver was respectively five and two times lower in the Canche compared to the Seine and Tamar. The concentration of Cd appeared very low in the Canche compared to the two other estuaries; it was 30 times and 240 times lower in the Canche compared respectively to the Seine and Tamar (Table 3).

3.3. Enzymatic activities

Contrasted patterns were found between the two antioxidant enzymes, SOD and CAT. In 2009 and 2010, the Seine cohorts showed a significantly lower SOD activity compared to the Canche cohorts. The Tamar cohort showed the significantly highest SOD activity in 2009 (Fig. 3); no data were available for this estuary in 2010. In 2009, the CAT activity in the Canche was significantly lower than in the Seine and Tamar. However, in 2010, no significant difference in CAT activity was detected between the Seine and Canche (Fig. 3).

In 2009 the 0+ cohort showed a higher CCO activity in the Seine than in the Canche and Tamar (Fig. 4). In 2010, the 0+ cohort in the Seine still showed the highest CCO activity. No significant difference in CCO activity was observed between the 0+ fish in the Tamar and Canche in 2009. In 2010, no significant difference in CCO activity was detected for the 1+ cohort between the Seine and Canche (Fig. 4).

3.4. Gene expression

Gene expression levels were compared between Canche and Tamar in 2009 (0+ cohort), and between Canche and Seine in 2010 (0+ and 1+ cohorts). In 2009, no significant difference in BHMT expression levels was detected between 0+ from the Canche

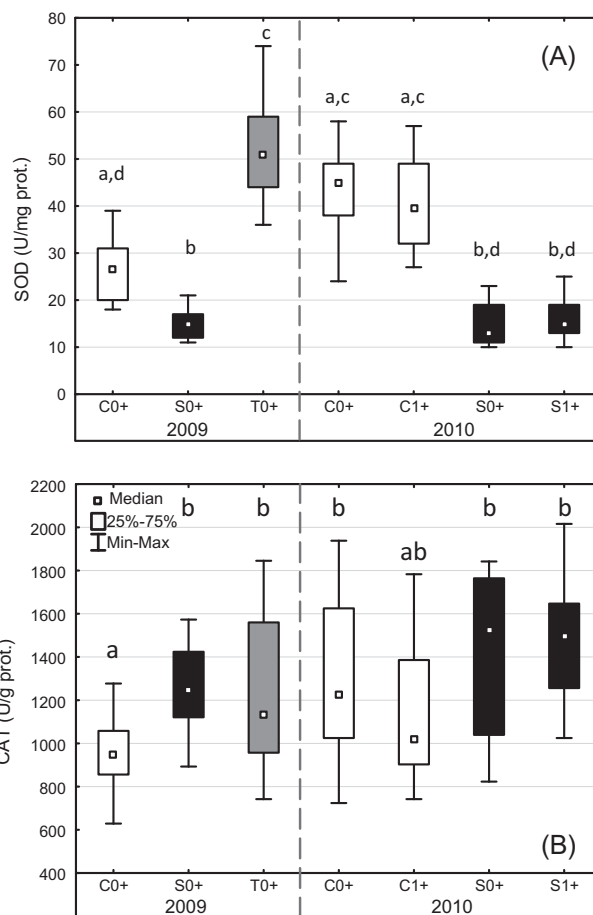


Fig. 3. Activities of antioxidant enzymes: SOD (chart A) and CAT (chart B) of flounders from the Canche (C), the Seine (S) and the Tamar (T) considering 0+ and 1+ cohorts. (Statistics: letters indicate significant differences between populations; $P < 0.05$.)

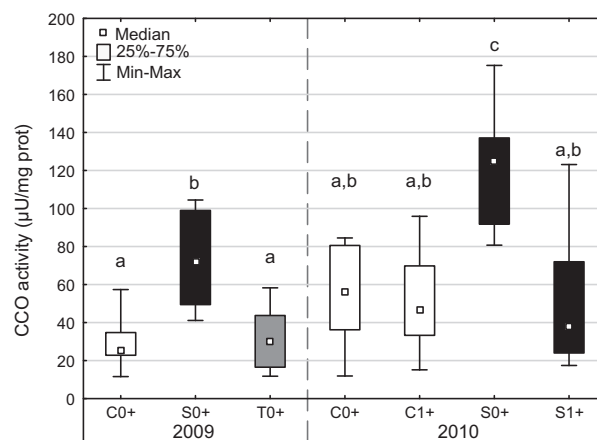


Fig. 4. CCO activities of flounders from the Canche (C), the Seine (S) and the Tamar (T) considering 0+ and 1+ cohorts. (Statistics: letters indicate significant differences between populations; $P < 0.05$.)

Table 3

Loads of metals detected in liver of flounder juveniles (0+ cohort) from the Seine, Canche and Tamar (mean \pm MD in $\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight).

	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Canche	1.833 \pm 0.31	0.087 \pm 0.03	0.009 \pm 0.001
Seine	9.2 \pm 0.73	0.19 \pm 0.11	0.257 \pm 0.03
Tamar	8.6 \pm 1.67	0.127 \pm 0.01	2.167 \pm 1.16

and Tamar (Fig. 5). In 2010, an up-regulation of the BHMT expression was observed in 0+ from the Seine compared to those from the Canche, but this trend between the two estuaries was not confirmed for the 1+ cohort. No significant difference of CYP1A1 expression level was shown between the estuaries, in 2009 as in 2010, considering the 0+ and 1+ cohorts (Fig. 5). No significant

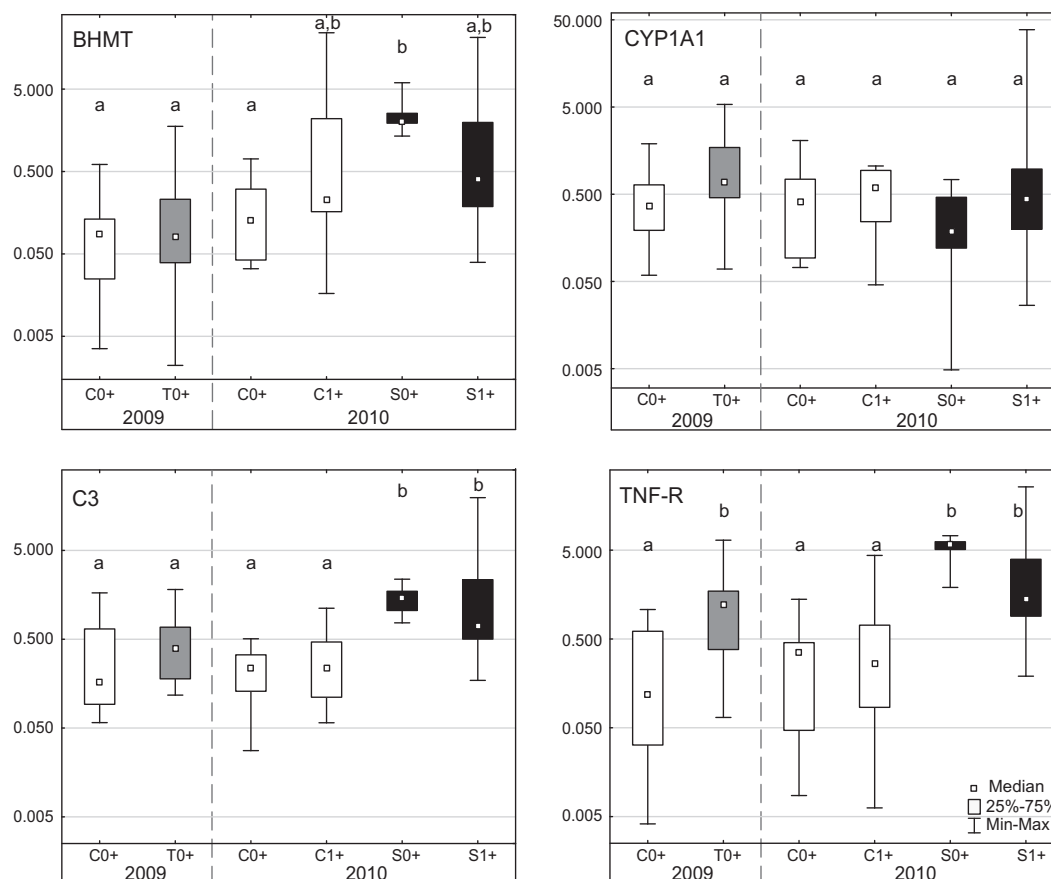


Fig. 5. Relative expression of 4 transcripts (BHMT, CYP1A1, C3 and TNF-R) in European flounders from the Canche (C), Seine (S) and Tamar (T) considering 0+ and 1+ cohorts. (Statistics: letters indicate significant differences between populations; $P < 0.05$.)

difference was detected in C3 expression levels between 0+ from the Canche and Tamar, in 2009. In contrast, in 2010, a significant up-regulation of C3 expression was observed in 0+ and 1+ cohorts from the Seine in comparison to those from the Canche (Fig. 5). A general up-regulation of the TNF-R expression level was apparent in the Tamar (in 2009) and the Seine (in 2010) in comparison to the Canche, considering the 0+ and 1+ cohorts (Fig. 5).

3.5. Condition factor and life history patterns

In 2009, the condition factor of the young of the year cohort (0+) collected in the Seine and Tamar estuaries was lower than in the Canche (Fig. 6). Furthermore, in the same year, the average fish length was lower in the Canche than in the Seine and Tamar and the highest growth rate during the summer was observed in the Seine (Table 1). In 2010, no significant difference in the condition factor was detected among estuaries, whatever the considered cohort (Fig. 6). Similarly, no significant difference in the average fish length was found between estuaries for the 0+ cohort but a higher length of the 1+ fish was showed in the Seine than in the Canche (Table 1). Finally, the average fish length of the 0+ cohort in the Seine was lower in 2010 compared to 2009 (Table 1).

The Sr profiles were analyzed along the otoliths (Fig. 7), and variations of the signal were large in the Tamar and Seine (respectively 236–2285 ppm and 133–2813 ppm), and rather limited in the Canche (183–1287 ppm). A similar average profile was detected in the Tamar and Seine, with a high interindividual variability, i.e. a strong decrease of the Sr concentration leading to a short plateau of low Sr concentration (300–500 ppm), followed by a progressive increase of the concentration to values around

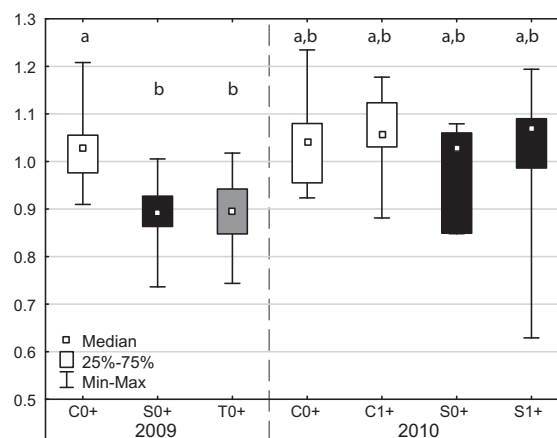


Fig. 6. European flounder condition factor in the Canche (C), Seine (S) and Tamar (T), considering 0+ and 1+ cohorts. (Statistics: letters indicate significant differences between populations; $P < 0.05$.)

1700–2000 ppm (Fig. 7). In contrast, in the Canche estuary, after the rapid Strontium decrease, the Sr concentration remained quite low (<1000 ppm) along the otolith (Fig. 7).

3.6. Correlation between biomarkers

Correlation analyses revealed contrasted results among estuaries. No significant correlation between biomarkers was detected in the Tamar (data not shown), whereas significant correlations were

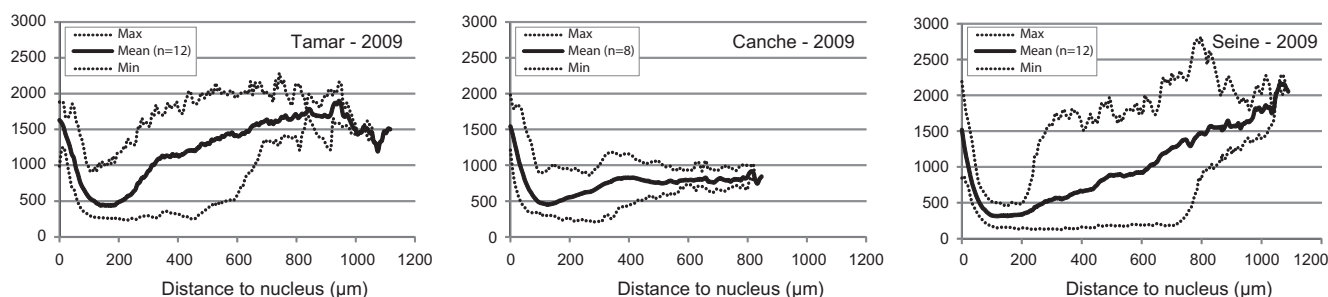


Fig. 7. Strontium profiles (in ppm) normalized to ^{43}Ca from LA-ICP-MS analysis of otoliths from European flounder captured in the Tamar, Canche and Seine estuaries, in 2009.

observed for the 0+ and 1+ cohorts in the Canche and Seine estuaries (Table 4).

Thus, significant correlations were detected between:

- SOD activity and BHMT expression ($r = -0.76$), and CAT activity and TNF-R expression ($r = -0.94$), in the 0+ cohort from the Canche.
- Phagocytosis and C3 expression ($r = 0.68$), SOD activity and CYP1A1 expression ($r = -0.61$), C3 and CYP1A1 expressions ($r = 0.71$), in the 1+ cohort from the Canche.
- Phagocytosis and condition factor ($r = -0.94$), CCO and condition factor ($r = 0.83$), CYP1A1 and BHMT expressions ($r = 0.83$), in the 0+ cohort from the Seine.
- Condition factor and BHMT ($r = -0.60$), condition factor and CYP1A1 ($r = -0.63$), CCO and BHMT ($r = 0.61$), C3 and BHMT ($r = 0.58$), CYP1A1 and BHMT ($r = 0.77$), C3 and TNF-R ($r = 0.49$), C3 and CYP1A1 ($r = 0.44$), and finally TNF-R and CYP1A1 ($r = 0.47$), in the 1+ cohort from the Seine.

4. Discussion

4.1. Contaminant load

In the present study, the analysis of heavy metals in fish liver (Cu, Pb, Cd) underlined limited metallic concentrations in the Canche estuary, compared to the polluted sites: the Seine and Tamar.

This result confirmed the pristine character of the Canche estuary, where previous studies detected low levels of heavy metals and PAHs in sediments (Amara et al., 2007, 2009). Furthermore, a recent analysis confirmed the limited heavy metal load in liver and gill tissues of juvenile flounder from the Canche, compared to fish from the Seine (Kerambun et al., 2013). Previous investigations also revealed a high Cd concentration in adult flounder liver from the Seine estuary, with an average Cd concentration of $0.18 \mu\text{g g}^{-1}$ wet weight (Marchand et al., 2004). Furthermore, in the present study, the Cd concentration in fish liver from the Tamar was 10 and 240 times higher than those detected respectively in the Seine and Canche. This result confirmed that the ancient mining activities (Langston et al., 2003) led to a chronic metallic contamination in the Tamar estuary.

Concentrations in organic pollutants in sediment and fish tissues were not investigated in this study. However, according to the literature, the Seine is one of the most polluted estuary in France since it flows through high populated and industrial regions and shows high concentrations of PAHs in sediment ($1275 < \sum \text{main PAHs} < 12,492 \mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight; Cachot et al., 2006), and high levels of PCBs in fish tissues (Schnitzler et al., 2011). The Tamar is probably less polluted by organic pollutants than the Seine (Shaw et al., 2011), but still displays a significant PAHs contamination in sediment linked to the surrounding urban areas and dockyards ($4929 < \sum \text{main PAHs} < 7410 \mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight, in Woodhead et al., 1999).

Table 4

Pearson's correlation between, condition factor (CF), phagocytosis capacity (phago.), CCO activity, antioxidant enzymes (SOD and CAT) and expression of 4 transcripts (BHMT, CYP1A1, C3 and TNF-R) measured in flounder 0+ and 1+ cohorts, from the Seine and Canche in 2010.

	CF	Phago.	CCO	SOD	CAT	BHMT	C3	TNF-R	CYP1A1		CF	Phago.	CCO	SOD	CAT	BHMT	C3	TNF-R	CYP1A1
Seine – 0+										Canche – 0+									
CF	1	-0.94**	0.83*	0.66	-0.43	-0.49	0.43	-0.20	-0.43	CF	1	0.24	-0.07	-0.01	0.24	-0.46	0.12	-0.68	-0.15
Phago.		1	-0.77	-0.2	0.77	0.43	-0.66	0.10	0.49	Phago.		1	0.18	-0.22	-0.20	-0.21	0.32	0.19	-0.48
CCO			1	0.31	-0.66	-0.77	0.2	0.10	-0.6	CCO			1	0.05	0.05	-0.38	0.13	-0.45	-0.02
SOD				1	-0.01	-0.09	-0.14	0.20	-0.14	SOD				1	0.38	-0.76*	-0.17	-0.10	0.25
CAT					1	0.43	-0.54	0.30	0.26	CAT					1	0.26	0.21	-0.94**	0.14
BHMT						1	0.26	-0.50	0.83*	BHMT						1	0.07	-0.26	0.21
C3							1	-0.20	-0.03	C3							1	-0.29	0.42
TNF-R								1	-0.7	TNF-R								1	0.05
CYP1A1									1	CYP1A1									1
Seine – 1+										Canche – 1+									
CF	1	0.17	0.29	0.13	0.21	-0.60**	-0.32	-0.11	-0.63**	CF	1	0.24	0.01	-0.15	-0.4	-0.08	0.22	-0.48	-0.04
Phago.		1	-0.27	0.02	-0.09	-0.25	0.12	-0.08	-0.25	Phago.		1	-0.54	-0.25	-0.15	0.10	0.68*	-0.47	0.42
CCO			1	0.47	0.21	0.61*	0.52	0.24	-0.08	CCO			1	0.23	-0.43	-0.44	-0.24	-0.11	-0.38
SOD				1	0.08	0.32	0.35	-0.05	-0.02	SOD				1	-0.30	-0.20	-0.57	-0.24	-0.61*
CAT					1	-0.23	0.03	-0.03	-0.36	CAT					1	0.05	-0.05	0.21	0.18
BHMT						1	0.58**	0.39	0.77***	BHMT						1	0.27	0.25	0.53
C3							1	0.49*	0.44*	C3							1	-0.14	0.71**
TNF-R								1	0.47*	TNF-R								1	-0.12
CYP1A1									1	CYP1A1									1

Bold values in the matrix were significantly different.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

4.2. Antioxidant responses

The contaminants can lead to oxidative damage which may alter cellular or higher biological functions (Livingstone, 2001). In the present study, antioxidant responses were assessed by measuring the SOD and CAT enzymatic activities. In 2009 and 2010, flounder from the polluted Seine showed a lower SOD activity compared to those from the less contaminated Canche. An inverse trend was detected for the CAT activity, which was higher in the Seine than in the Canche in 2009. Flounder from the polluted Tamar displayed a higher SOD and CAT activities compared to those from the Canche.

Data from the literature report higher, unchanged or lower activities of antioxidant enzymes in fish from polluted sites compared with cleaner environments (Livingstone, 2001; van der Oost et al., 2003). For example, Ben Ameer et al. (2012) observed lower CAT and SOD activities in the liver of *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* from contaminated sites compared with fish from a reference site, thus indicating an inhibition of antioxidant enzymes by contaminants. Such inhibition could explain the lower SOD activity in fish from the Seine. Conversely, an increase in antioxidant enzyme activities were observed in fish experimentally submitted to a variety of organic and metal contaminants (Livingstone, 2001), and this could explain the higher antioxidant activities in the Tamar than in the Canche. Overall, flounder from the two polluted Seine and Tamar estuaries displayed contrasted antioxidant activities, and the modulation of SOD and CAT activity in these estuaries might be related to the diversity of the contaminant mixtures in the field: a very complex cocktail of organic and metallic pollutants in the Seine, and a pollution mainly characterized by a mixture of metals and PAHs in the Tamar.

4.3. Energetic metabolism

The Cytochrome C Oxidase (CCO) forms the complex IV of the mitochondrial chain, and catalyzes the transfer of electrons from reduced cytochrome C to molecular oxygen (Tsiftoglou et al., 2006). Thus, the CCO activity is an indicator of aerobic metabolism (Gagnon and Holdway, 1999). Several experiments highlighted a decrease of CCO activity in fish submitted to petroleum hydrocarbons (Cohen et al., 2005) or metals (Couture et al., 2008). Other experimental contaminations led to an enhancement of the CCO activity in fish (e.g. Gagnon, 2002; Garceau et al., 2010).

In the present study, the 0+ cohort displayed a higher CCO activity in the Seine than in the Canche, in both 2009 and 2010. We suggest that the high level of chemical stress in the Seine could increase the aerobic respiration of young juveniles, thus reflecting the energetic cost to cope with the environmental stress. In addition, the significant positive correlation found between the CCO activity and the condition factor in the 0+ cohort from the Seine highlights that a high metabolic rate is necessary to maintain fish condition in this heavily polluted estuary. A similar increase of the energetic production was observed for juvenile flounder exposed to the increasing impact of pollutants from summer to autumn in a contaminated estuary (Evrard et al., 2013).

The similar baseline levels of CCO activity that were observed for the 1+ cohorts from both the Seine and Canche could be linked: (1) to the effect of increasing age and decreasing growth rate classically described for juvenile fish in estuaries (Fonseca et al., 2006), thus allowing a better capacity for fish to respond to stress; and/or (2) to a possible selective pressure induced by contaminants on genes involved in the energetic metabolism (Calvès, 2011), that could progressively select for genotypes able to reduce the energetic cost of the response to chemical stress.

The apparent absence of any effect of the pollution on the CCO activity of the 0+ fish from the Tamar could be linked to the particular nature of the contaminant cocktail in this system. We cannot

exclude that this biomarker may not be sensitive enough to detect biological effects of pollutants in flounder from this estuary.

4.4. Detoxification activities

The BHMT is a methyl transferase catalyzing the conversion of homocysteine to methionine; the cysteine is considered as an important precursor in glutathione synthesis and the methionine metabolism is a critical component of phase II detoxification processes (Ou et al., 2007). Thus the BHMT has been proposed to act as a detoxification enzyme and/or to be involved in oxidative stress response in experimental contaminations conducted on flounder (Evrard et al., 2010b; Marchand et al., 2006). Furthermore, a recent work on the relationships between genotypes and phenotypes in natural flounder populations suggested that the polymorphism of BHMT could be related to the possible tolerance of populations facing complex mixtures of mainly organic pollutants (Marchand et al., 2013); this trend being not observed in the population impacted principally by heavy metals (i.e. the Gironde estuary).

In the present study, the negative correlation between SOD activity and BHMT expression in the 0+ cohort from the Canche could confirm that BHMT is involved in antioxidant response. Furthermore, the up-regulation of the BHMT expression was only observed for the 0+ cohort in the heavily polluted Seine system compared to the same cohort in the pristine Canche system, but no alteration of the BHMT expression was detected in the polluted Tamar estuary. This differential BHMT regulation between 0+ cohorts from the Seine and Tamar strengthens our previous hypothesis in this study suggesting that the different nature of the chemical stress in these two systems may result in contrasted responses of flounder populations.

No significant alteration of the CYP1A1 expression was observed in the heavily polluted (Seine) compared to the pristine estuary (Canche), considering both 0+ and 1+ cohorts. The Seine estuary is highly contaminated by PCBs and PAHs, inducing a significant increase of EROD activities in adult flounder (Minier et al., 2000). Thus, in the present study, the lack of CYP1A1 mRNA induction in Seine juvenile flounder is rather surprising. However the expression level of CYP1A1 is not always correlated with the EROD activity, a time-lag may exist between mRNA production and protein formation and many proteins are post-transcriptionally regulated (Nikinmaa and Rytönen, 2011). Moreover, sediments are chronically contaminated in the Seine estuary, with very high concentrations of PAHs and PCBs along the whole brackish and freshwater habitats exploited by flounder (Cachot et al., 2006, 2013; Schnitzler et al., 2011). As a consequence, the CYP1A1 system may become unresponsive after long-term exposure to PAHs, thus explaining the low expression of CYP1A1 in juveniles from the Seine. This hypothesis is supported by an experimental contamination which showed a significant CYP1A1 induction after one month of exposure, but no effect after a six months exposure (Reynolds et al., 2003).

As a last alternative hypothesis, the absence of CYP1A1 induction in the Seine might be the result of an adaptation of the population submitted to strong contamination over several decades (Wirgin et al., 2011; Wirgin and Waldman, 1998). In the Seine, a significant positive correlation was detected between the expressions of BHMT and CYP1A1, for the 0+ and 1+ cohorts. Furthermore, significant negative correlations between BHMT and CF and between CYP1A1 and CF were only observed in the 1+ cohort from the Seine. We suggest that these correlations specifically detected in the heavily contaminated Seine might be the consequence of a possible adaptation to chemical stress, with selective pressures retaining two distinct physiological orientations in this population: (1) individuals showing a high detoxification capacity, but a possible physiological cost associated with the detoxification, i.e. a

reduced condition factor and (2) individuals showing a reduced detoxification capacity, but a higher condition factor. Finally, the present study confirms previous results depicting, in flounder populations along the French Atlantic coast, the physiological cost of tolerance to toxicants, and the possibility to detect differential physiological strategies within an estuary in response to environmental stress (Marchand et al., 2004).

In the present study, a similar CYP1A1 expression level was observed in juvenile fish in Tamar and Canche, despite a significant load of PAHs in the sediment of the Tamar (Woodhead et al., 1999). The absence of a CYP1A1 induction in the Tamar could be also linked to a difference between transcriptomic and enzymatic signals, as suggested above for the Seine estuary. However this hypothesis must be considered cautiously, because a previous study comparing EROD activities in eel (*Anguilla anguilla*) over several estuaries in UK showed a limited activity in the Tamar compared to heavily polluted estuaries (Doyotte et al., 2001). Thus, another hypothesis could be developed in the Tamar. PAHs in sediments are not widely distributed over the whole Tamar estuarine system as observed in the Seine, since the highest PAHs levels are mainly detected in particular spots in the middle part of the Tamar estuary, close to sources of pollution as bridges (Shaw et al., 2011). However, juvenile flounder exploits the whole Tamar system with regular movements between the different estuarine habitats (see below: brackish and freshwater habitats detected by the otolith microchemistry). As a consequence, juvenile flounder are probably submitted to a relatively limited exposition to PAHs in the Tamar, thus explaining the absence of a significant CYP1A1 induction.

In future investigations, the transcriptomic signals detected for the CYP1A1 in the Seine and Tamar should be confirmed at the protein level. Concentration in CYP1A protein could be assessed (e.g. by ELISA) and the presence of detoxification activity could be tested by measuring the EROD activity.

4.5. Immune responses

TNF-R is the fish tumor necrosis factor receptor of TNF α (Park et al., 2003). The C3 complement and TNF system play a major role in fish immunity, and are involved in numerous innate and acquired immune responses (Kerr et al., 2008; Qi et al., 2011). An up-regulation of C3 and TNF-R expression was observed in juvenile flounder exposed to PAHs and PCBs mixtures (Dupuy et al., 2014). Moreover, the TNF-R system and complement system are implicated in the inflammation process (Bayne et al., 2001; Wang et al., 2012; Watts et al., 2001), that could be associated with the fish response to high concentrations of contaminants (e.g. Leaver et al., 2010; Pacheco and Santos, 2002).

In the present study, an up-regulation of C3 and TNF-R expressions was detected in the Seine compared to the Canche for both 0+ and 1+ cohorts, while only the TNF-R up-regulation was observed in the Tamar compared to the Canche. We hypothesize that the higher expression level of these two genes may indicate a higher infection rate of flounder in the Seine and possibly in the Tamar. However this hypothesis must be considered cautiously, because fish also displayed a decreased phagocytosis capacity in the Seine, which is in conflict with an activation of the immune system due to infection. Furthermore, the 1+ cohort from the Seine showed a positive correlation between the expression levels of C3, TNF-R, and CYP1A1, thus underlining possible links between immune responses and detoxification processes in heavily contaminated systems.

Flounder from the Tamar displayed an up-regulation of the TNF-R expression but no difference in C3 expression, when compared to those from the Canche. Similar trends were detected in European sea bass exposed to light cycle oil, along with an increasing activity of the alternative complement pathway

(Bado-Nilles et al., 2011). We suggest that the TNF-R up-regulation in the Tamar, probably induced by high metallic stress and moderate PAHs level, could indicate an increase of apoptosis and cell necrosis in flounder liver, as observed in different cellular models (Smith et al., 1994). Further histopathological investigations should be conducted on flounder liver to confirm this hypothesis in the Tamar estuary. An epidemiological survey on histopathological liver lesions already confirmed that 0+ European flounder may serve as a valuable bioindicator for assessing the health status of euryhaline fish populations (Cachot et al., 2013).

The phagocytosis capacity is a widely used biomarker in ecotoxicology, particularly for fish and mollusk models (Bols et al., 2001; van der Oost et al., 2003). Many xenobiotics can inhibit the activity of macrophages, leading to a decrease of their phagocytosis capacity (Bols et al., 2001; Fournier et al., 2000). For example, Danion et al. (2011) observed a decrease of the phagocytosis activity in European sea bass exposed to chronic hydrocarbons pollution. In the present study, both 0+ and 1+ flounder cohorts in the heavily polluted Seine displayed a lower phagocytosis capacity compared to fish from the pristine Canche. The phagocytosis capacity was negatively correlated with the condition factor, particularly in the Seine 0+ cohort, and this result underlines that the phagocytosis is an energy-demanding process for fish. An opposite trend exists in mollusks, where a positive correlation between phagocytosis and condition factor or metabolic activity was detected (Blaise et al., 2002).

4.6. Condition factor and life history traits

The condition factor is considered in the literature as a proxy of the fish health status, based on the general assumption that, for a given length, heaviest fish are in better condition (Froese, 2006). Thus the condition factor could be considered in ecotoxicology as a first-level screen to identify the impact of a chemical stress (van der Oost et al., 2003). For example, Amara et al. (2007) underlined that juvenile sole (*Solea solea*) displayed a higher condition factor in the Canche estuary compared to polluted sites in the same area. In the present study, the significantly lower condition factor of the 0+ cohort in the polluted Seine and Tamar estuaries compared to the Canche in 2009, was not confirmed in 2010 where no difference was detected between the estuaries, considering the 0+ and 1+ cohorts. We suggest that in 2009, the low condition factor in the Seine and Tamar was probably indicative of a poor fish health status in polluted systems, whereas in 2010 confounding factors not directly linked to pollutants (e.g. abundance of prey (Dutil et al., 2003), salinity (Lambert et al., 1994), sex-ratio and climate (Guimaraes et al., 2009; Lambert and Dutil, 1997) possibly masked the impact of chemical stress.

According to Amara et al. (2009), the average daily growth of flounder in spring was slower in the Seine than in the Canche, confirming that the growth rate of 0+ fish could be affected by pollution. A contrasted result was observed in the present study, particularly in 2009, where the highest growth rate in summer and longest total length at the beginning of autumn were found in the Seine, compared to the Canche. However the two studies must be compared with caution, since these opposed results might be linked to a confounding seasonal effect rather than to inter-annual variability in the chemical stress intensity; for example heat stress could also seriously impact the growth of 0+ juveniles, particularly in summer (see below).

Patterns of life history traits in flounder juveniles were also explored in the present study, considering the link between salinity and Sr concentrations in flounder otoliths (Morais et al., 2011): Sr concentrations lower than 500 ppm, between 1300 and 1700 ppm, or above 2000 ppm, are respectively indicative of residence in a freshwater environment, of estuarine residency or of

oceanic habitat. Our study showed a similar pattern of habitat exploitation by juveniles in the two polluted estuaries, the Seine and Tamar. After a probable hatching in oceanic habitat, fish were recruited in estuaries and stayed a short period in freshwater, before migrating progressively downstream and staying in the estuarine or marine waters. The life history pattern detected in this study is essential to better understand the relationship between juvenile fish and their estuarine habitats, and underlines that biomarkers are probably integrating fish responses to environmental forcing over the whole system in Seine and Tamar. Thus, we suggest that fish responses to stress might be linked: (1) in the Seine, to a chronicle exposition to widely distributed organic and metallic pollutants, and (2) in the Tamar, to a chronicle exposition to metallic pollutants over the whole estuary, the impact of PAHs being more limited to particular spots. This hypothesis could explain the apparent lower impact of the pollution on fish from the Tamar compared to the Seine (no alteration on the energetic metabolism, no increase in detoxification processes), whereas other biomarkers displayed “convergent responses” in the two estuaries (alteration of antioxidant responses, perturbation of the immunity system, reduction of the condition factor).

The otolith microchemistry carried out on fish from the pristine Canche estuary underlined that after a probable hatching in marine habitat, juvenile flounder displayed a particular migration pattern as they stayed in the upper part of the system characterized by low salinity environments. Our study confirms that flounder exhibits high life history diversity among basins (Daverat et al., 2012). The differential use of marine and estuarine habitats by juvenile flounder between the Canche and both the Seine and Tamar could be linked to the reduced size and depth of the first system compared to the two others. In summer – beginning of autumn, shallower waters in the Canche might be more susceptible to an increase in temperature than deeper waters in the Seine and Tamar. Therefore, we suggest that the reduced growth rate of juvenile flounder in the Canche estuary (in summer 2009) might be mainly linked to thermal stress, the reduced salinity in the upper part of the system inducing a very limited physiological cost for this euryhaline fish (Lundgreen et al., 2008). Finally, this study underlines that different fish responses between estuaries, considering particular biomarkers (like growth rate), could be more related to confounding factors associated with the distribution of fish within estuaries, than to variations in the pollution level among estuaries.

5. Conclusion

In the present study, the contamination load in fish tissue and the multi-parametric approach conducted in juvenile flounder underlined contrasted levels of contamination in the sampled estuaries: the Canche was characterized as a pristine site, whereas the juveniles in Seine and Tamar displayed significant responses to high level of chemical stress induced respectively by a complex cocktail of organic and metallic contaminants, and probably a mixture of heavy metals and PAHs.

Fish health status estimated by the condition factor indicated a lower condition in the polluted systems. Globally, some responses in juvenile flounder were convergent among the polluted estuaries (modulation of antioxidant responses, alteration of the immunity system), while discrepancies were observed for particular biomarkers (energetic metabolism, detoxification activities). Numerous correlations between biomarkers were observed, particularly in the most heavily polluted system, i.e. the Seine estuary, where activities of detoxification were positively correlated with levels of immune response, but could be negatively correlated with the condition factor. We suggest that these physiological orientations

could be the results of a selective pressure induced by the contaminants, particularly in the Seine estuary. Our results confirmed the relationships between the immune system and the detoxification processes in heavily polluted systems (Reynaud and Deschaux, 2006; Reynaud et al., 2008). We demonstrated that immune responses in juvenile flounder to heavy metals or to mixtures of pollutants are complex, but could become very pertinent biomarkers to estimate the quality of estuarine waters and the health status of estuarine fish populations.

Furthermore in this study, flounder life history traits were investigated by the analysis of otolith microchemistry, to identify how juveniles exploit their habitat. This approach is very common in fish ecology, but is still very rare in ecotoxicology. We observed in the polluted systems (Seine and Tamar) that juvenile fish exploited the whole range of their habitat (brackish and freshwater habitats), thus integrating in their responses the average presence of contaminants over the whole estuarine system. On the other hand, in the pristine site (Canche), juveniles stayed upstream, thus living some particular years in harsh thermal conditions which could explain their reduced growth rate compared to fish from the polluted sites. We suggest that in a next future, studying the life-history of fish could become an efficient strategy to better understand the impact of confounding factors on their response to chemical stress in complex estuarine systems.

Acknowledgments

This study was supported firstly by the EEC INTERREG IV program: DIESE (50% of a PhD grant was obtained by the first author, for the development of immune markers in ecotoxicology), and secondly by the DEVIL-INERIS program and by the EVOLFISH project (ANR-VMCS). Financial support was also provided by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. Michel Fournier) and Collège Doctoral International de l'Université Européenne de Bretagne. Authors thank Carole Capitaine for her excellent technical assistance, and also wish to thank Dr. W. Langston for fish sampling in the Laboratory of the Marine Biological Association, in Plymouth.

References

- Amara, R., Meziane, T., Gilliers, C., Hermel, G., Laffargue, P., 2007. Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 351, 201–208.
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., Minier, C., 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia* 627, 87–98.
- Babo, S., Vasseur, P., 1992. In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicol.* 22, 61–68.
- Bado-Nilles, A., Quentel, C., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J.L., Auffret, M., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., 2011. In vivo effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 74, 1896–1904.
- Bayne, C.J., Gerwick, L., Fujiki, K., Nakao, M., Yano, T., 2001. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Develop. Comp. Immunol.* 25, 205–217.
- Beck, M., Heck Jr, K., Able, K., Childers, D., Eggleston, D., Gillanders, B., Halpern, B., Hays, C., Hoshino, K., Minello, T., 2001. The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *BioScience* 51, 633–641.
- Ben Ameur, W., de Lapuente, J., El Megdiche, Y., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Driss, M.R., Borràs, M., 2012. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 241–251.
- Blaise, C., Gagne, F., Pellerin, J., Hansen, P.D., Trottier, S., 2002. Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Environ. Toxicol.* 17, 170–186.
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., Lee, L.E.J., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Develop. Comp. Immunol.* 25, 853–873.
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 239–262.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Fournier, M., 1999. *Manual of Immunological Methods*. CRC Press, Boston, USA.
- Cabon, J.Y., Burel, L., Jaffrennou, C., Giamarchi, P., Bautin, F., 2007. Study of trace metal leaching from coals into seawater. *Chemosphere* 69, 1100–1110.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicol.* 79, 257–267.
- Cachot, J., Cherel, Y., Larcher, T., Pfohl-Leschkowicz, A., Laroche, J., Quiniou, L., Morin, J., Schmitz, J., Burgeot, T., Pottier, D., 2013. Histopathological lesions and DNA adducts in the liver of European flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Seine estuary versus two reference estuarine systems on the French Atlantic coast. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 723–737.
- Calvès, I., 2011. Effets du réchauffement climatique, de l'hypoxie et de la contamination chimique sur les réponses évolutives de populations de flet (*Platichthys flesus*). Science de la mer. Université de Bretagne Occidentale, Brest, p. 204.
- Calvès, I., Lavergne, E., Meistertzheim, A.L., Charrier, G., Cabral, H., Guinand, B., Quiniou, L., Laroche, J., 2013. Genetic structure of European flounder *Platichthys flesus*: effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 472, 257–273.
- Cohen, A., Gagnon, M., Nuggeoda, D., 2005. Alterations of metabolic enzymes in Australian Bass, *Macquaria novemaculeata*, after exposure to petroleum hydrocarbons. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 200–205.
- Courrat, A., Lobry, J., Nicolas, D., Laffargue, P., Amara, R., Lepage, M., Girardin, M., Le Pape, O., 2009. Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 81, 179–190.
- Couture, P., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008. Seasonal and regional variations in metal contamination and condition indicators in Yellow Perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. III. Energetic and Physiological Indicators. *Human Ecol. Risk Assess.* 14, 146–165.
- Cowley, P.D., Whitfield, A.K., 2002. Biomass and production estimates of a fish community in a small South African estuary. *J. Fish Biol.* 61, 74–89.
- Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C., 2011. Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquatic Toxicol.* 105, 300–311.
- Daverat, F., Morais, P., Dias, E., Babaluk, J., Martin, J., Eon, M., Fablet, R., Pécuyer, C., Antunes, C., 2012. Plasticity of European flounder life history patterns discloses alternatives to catadromy. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 465, 267–280.
- de Pontual, H., Lagardère, F., Amara, R., Bohn, M., Ogor, A., 2003. Influence of ontogenetic and environmental changes in the otolith microchemistry of juvenile sole (*Solea solea*). *J. Sea Res.* 50, 199–211.
- Dolbeth, M., Martinho, F., Viegas, I., Cabral, H., Pardal, M.A., 2008. Estuarine production of resident and nursery fish species: conditioning by drought events? *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 78, 51–60.
- Doyotte, A., Mitchelmore, C.L., Ronisz, D., Mcevoy, D., Livingstone, D.R., Peters, L.D., 2001. Hepatic 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity in eel (*Anguilla Anguilla*) from the Thames estuary and comparisons with other United Kingdom estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 42 (12), 1313–1322.
- Dupuy, C., Galland, C., Devaux, A., Bony, S., Loizeau, V., Danion, M., Pichereau, V., Fournier, M., Laroche, J., 2014. Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-2563-y>.
- Dutil, J.-D., Lambert, Y., Chabot, D., 2003. Winter and spring changes in condition factor and energy reserves of wild cod compared with changes observed during food-deprivation in the laboratory. *ICES J. Mar. Sci.: J. Conseil* 60, 780–786.
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Burgeot, T., Riso, R., Budzinski, H., Du, M., Quiniou, L., Laroche, J., 2010a. Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers* 15, 111–127.
- Evrard, E., Marchand, J., Theron, M., Pichavant-Raffini, K., Durand, G., Quiniou, L., Laroche, J., 2010b. Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 152, 321–331.
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Cachot, J., Charrier, G., Quiniou, L., Laroche, J., 2013. Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multistress in the Vilaine estuary, during a 6-month survey. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 676–689.
- Florin, A.-B., Sundblad, G., Bergström, U., 2009. Characterisation of juvenile flatfish habitats in the Baltic Sea. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 82, 294–300.
- Fonseca, V.F., Vinagre, C., Cabral, H.N., 2006. Growth variability of juvenile soles *Solea solea* and *Solea senegalensis*, and comparison with RNA: DNA ratios in the Tagus estuary, Portugal. *J. Fish Biol.* 68, 1551–1562.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P., 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *Am. Zool.* 40, 412.
- Froese, R., 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *J. Appl. Ichthyol.* 22, 241–253.
- Gagnon, M.M., 2002. Metabolic disturbances in fish exposed to sodium pentachlorophenolate (NaPCP) and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126), individually or combined. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 132, 425–435.
- Gagnon, M.M., Holdway, D.A., 1999. Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 44, 92–99.
- Galland, C., Dupuy, C., Capitaine, C., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., Pichereau, V., 2013. Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *J. Sea Res.* 75, 135–141.
- Garceau, N., Pichaud, N., Couture, P., 2010. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquatic Toxicol.* 98, 107–112.
- Gilliers, C., Amara, R., Bergeron, J.-P., 2004. Comparison of growth and condition indices of juvenile flatfish in different coastal nursery grounds. *Environ. Biol. Fishes* 71, 189–198.
- Guimaraes, L., Gravato, C., Santos, J., Monteiro, L.S., Guilhermino, L., 2009. Yellow eel (*Anguilla anguilla*) development in NW Portuguese estuaries with different contamination levels. *Ecotoxicology* 18, 385–402.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Lowe, D., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1111–1118.
- Houde, E., Rutherford, E., 1993. Recent trends in estuarine fisheries: predictions of fish production and yield. *Estuaries* 16, 161–176.
- Johnson, L.L., Landahl, J.T., Kubin, L.A., Horness, B.H., Myers, M.S., Collier, T.K., Stein, J.E., 1998. Assessing the effects of anthropogenic stressors on Puget Sound flatfish populations. *J. Sea Res.* 39, 125–137.
- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, L., Amara, R., 2013. A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere* 91, 498–505.
- Kerr, J.L., Guo, Z., Smith, D.W., Goss, G.G., Belosevic, M., 2008. Use of goldfish to monitor wastewater and reuse water for xenobiotics. *J. Environ. Eng. Sci.* 7, 369–383.
- Lambert, Y., Dutil, J.-D., 1997. Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of cod (*Gadus morhua*)? *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 54, 104–112.
- Lambert, Y., Dutil, J.-D., Munro, J., 1994. Effects of Intermediate and Low Salinity Conditions on Growth Rate and Food Conversion of Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 51, 1569–1576.
- Lamberth, S.J., Turpie, J.K., 2003. The role of estuaries in south african fisheries: economic importance and management implications. *African J. Mar. Sci.* 25, 131–157.
- Langston, W., Chesman, B., Burt, G., Hawkins, S., Readman, J., Worsfold, P., 2003. Characterisation of the South West European Marine Sites : Plymouth Sound and Estuaries cSAC, SPA. Occasional Publications, Marine Biological Association. Occ. Pub 9, 202p.
- Laroche, J., Gauthier, O., Quiniou, L., Devaux, A., Bony, S., Evrard, E., Cachot, J., Cherel, Y., Larcher, T., Riso, R., Pichereau, V., Devier, M.H., Budzinski, H., 2013. Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 738–748.
- Leaver, M.J., Diab, A., Boukouvala, E., Williams, T.D., Chipman, J.K., Moffat, C.F., Robinson, C.D., George, S.G., 2010. Hepatic gene expression in flounder chronically exposed to multiply polluted estuarine sediment: absence of classical exposure 'biomarker' signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways. *Aquatic Toxicol.* 96, 234–245.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Lundgreen, K., Kilerich, P., Tipsmark, C., Madsen, S., Jensen, F., 2008. Physiological response in the European flounder (*Platichthys flesus*) to variable salinity and oxygen conditions. *J. Comp. Physiol. B* 178, 909–915.
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M.-T., Laroche, J., 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicol.* 70, 327–343.
- Marchand, J., Tanguy, A., Charrier, G., Quiniou, L., Plee-Gauthier, E., Laroche, J., 2006. Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the European flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure. *Mar. Biotechnol.* 8, 275–294.
- Marchand, J., Quiniou, L., Laroche, J., 2013. Relationships between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *J. Xenobiotics* 3, e14.
- Minier, C., Levy, F., Rabal, D., Bocquené, G., Godefroy, D., Burgeot, T., Leboulenger, F., 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Mar. Environ. Res.* 50, 373–377.
- Morais, P., Dias, E., Babaluk, J., Antunes, C., 2011. The migration patterns of the European flounder *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758) (Pleuronectidae, Pisces) at the southern limit of its distribution range: ecological implications and fishery management. *J. Sea Res.* 65, 235–246.
- Munsch, C., Moisan, K., Truquet, I., Tronczynski, J., 1996. Caractérisation chimique de la contamination organique dans l'estuaire de la Seine. Rapport Seine-Aval 1996/FIN-3 Agence de l'Eau Seine-Normandie, France, pp. 41–60.
- Nikinmaa, M., Rytönen, K.T., 2011. Functional genomics in aquatic toxicology – do not forget the function. *Aquatic Toxicol.* 105, 16–24.
- Ou, X., Yang, H., Ramani, K., Ara, A.L., Chen, H., Mato, J.M., LU, S.C., 2007. Inhibition of human betaine-homocysteine methyltransferase expression by S-adenosylmethionine and methylthioadenosine. *Biochem. J.* 401, 87–96.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 53, 331–347.

- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 154, 536–541.
- Park, C.-I., Kurobe, T., Hirono, I., Aoki, T., 2003. Cloning and characterization of cDNAs for two distinct tumor necrosis factor receptor superfamily genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Develop. Comp. Immunol.* 27, 365–375.
- Pelletier, D., Dutil, J.D., Blier, P., Guderley, H., 1994. Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. *J. Comp. Physiol. B: Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 164, 179–190.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Qi, Z.-H., Liu, Y.-F., Wang, W.-N., Wu, X., Xin, Y., Lu, Y.-F., Wang, A.-L., 2011. Molecular characterization and functional analysis of a complement C3 molecule in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immunol.* 31, 1284–1290.
- Ramos, S., Ré, P., Bordalo, A.A., 2009. Environmental control on early life stages of flatfishes in the Lima Estuary (NW Portugal). *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 83, 252–264.
- Reynaud, S., Deschaux, P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic Toxicol.* 77, 229–238.
- Reynaud, S., Raveton, M., Ravanel, P., 2008. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: a review. *Aquatic Toxicol.* 87, 139–145.
- Reynolds, W.J., Feist, S.W., Jones, G.J., Lyons, B.P., Sheahan, D.A., Stentiford, G.D., 2003. Comparison of biomarker and pathological responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination. *Chemosphere* 52, 1135–1145.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 1999. In: Misener, S., Krawetz, S.A. (Eds.), *Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers Bioinformatics Methods and Protocols*. Humana Press, pp. 365–386.
- Salomon, S., Giamarchi, P., Le Bihan, A., 2000. Desirability approach for optimisation of electrothermal atomic absorption spectrometry factors in iron determinations. *Analyst* 28, 575–586.
- Sarasquete, C., Segner, H., 2000. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Sci. Total Environ.* 247, 313–332.
- Schnitzler, J.G., Thomé, J.P., Lepage, M., Das, K., 2011. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and trace elements in wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) off European estuaries. *Sci. Total Environ.* 409, 3680–3686.
- Shaw, J.P., Donderon, F., Moore, M.N., Negri, A., Dagnino, A., Readman, J.W., Lowe, D.R., Frickers, P.E., Beesley, A., Thain, J.E., Viarengo, A., 2011. Integration of biochemical, histochemical and toxicogenomic indices for the assessment of health status of mussels from the Tamar Estuary, UK. *Mar. Environ. Res.* 72, 13–24.
- Skerrett, D., 2010. A review of the European flounder *Platichthys flesus* – Biology, Life History and Trends in Population. International Marine & Environmental Consultancy MSc, Newcastle University.
- Smith, L., Conrad, H., 1956. A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome c by cytochrome c oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 63, 403–413.
- Smith, C.A., Farrah, T., Goodwin, R.G., 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959–962.
- Stevens, M., Maes, J., Ollevier, F., 2006. A spatially-explicit bioenergetics model of habitat quality for flounder *Platichthys flesus* in the Scheldt estuary. Intertidal and basin-wide habitat use of fishes in the Scheldt estuary, p. 93.
- Théron, M., Guerrero, F., Sebert, P., 2000. Improvement in the efficiency of oxidative phosphorylation in the freshwater eel acclimated to 10.1 MPa hydrostatic pressure. *J. Exp. Biol.* 203, 3019–3023.
- Tsiftoglou, A.S., Tsamadou, A.I., Papadopoulou, L.C., 2006. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol. Therap.* 111, 327–345.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Wang, P.-H., Wan, D.-H., Pang, L.-R., Gu, Z.-H., Qiu, W., Weng, S.-P., Yu, X.-Q., He, J.-G., 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily gene, TNF receptor superfamily gene and lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) gene from *Litopenaeus vannamei*. *Develop. Comp. Immunol.* 36, 39–50.
- Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M., 2001. Immune responses of teleost fish. *Aust. Vet. J.* 79, 570–574.
- Williams, T.D., Turan, N., Diab, A.M., Wu, H., Mackenzie, C., Bartie, K.L., Hrydziusko, O., Lyons, B.P., Stentiford, G.D., Herbert, J.M., Abraham, J.K., Katsiadaki, I., Leaver, M.J., Taggart, J.B., George, S.G., Viant, M.R., Chipman, K.J., Falciani, F., 2011. Towards a system level understanding of non-model organisms sampled from the environment: a network biology approach. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002126.
- Wirgin, I., Waldman, J.R., 1998. Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. *Mutat. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 399, 193–219.
- Wirgin, I., Roy, N.K., Loftus, M., Chambers, R.C., Franks, D.G., Hahn, M.E., 2011. Mechanistic Basis of Resistance to PCBs in Atlantic Tomcod from the Hudson River. *Science* 331, 1322–1325.
- Woodhead, R.J., Law, R.J., Matthiessen, P., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments around England and Wales, and their possible biological significance. *Mar. Pollut. Bull.* 38 (9), 773–790.
- Yamashita, Y., Tanaka, M., Miller, J.M., 2001. Ecophysiology of juvenile flatfish in nursery grounds. *J. Sea Res.* 45, 205–218.
- Ye, R., Lei, E., Lam, M., Chan, A., Bo, J., van de Merwe, J., Fong, A., Yang, M., Lee, J., Segner, H., Wong, C., Wu, R., Au, D., 2011. Gender-specific modulation of immune system complement gene expression in marine medaka *Oryzias latipes* following dietary exposure of BDE-47. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 2477–2487.

Chapitre 5 : Discussion et perspectives

Le but de cette thèse était, par une approche protéomique globale et sans *a priori*, d'étudier les mécanismes de la réponse du flet européen *Platichthys flesus* à la contamination chimique, et éventuellement d'identifier des biomarqueurs potentiels. Cette thèse s'appuyait sur un projet européen dans lequel une étude par marqueurs ciblés a été réalisée sur la même problématique.

Après avoir mis au point la méthode d'électrophorèse en deux dimensions chez le flet, deux approches ont été conduites : une approche expérimentale au cours de laquelle les poissons ont été contaminés par un cocktail de HAP/PCB construit pour refléter les concentrations trouvées dans la Seine (Cachot *et al.*, 2006 ; Abarnou and Duchemin, 2008) et une approche environnementale au cours de laquelle les réponses des poissons de 3 estuaires ont été comparées. Les trois estuaires choisis sont la Canche, la Tamar et la Seine. Alors que la Canche est considéré comme un estuaire de référence dans de nombreuses études (Amara *et al.*, 2009), la Seine est défini comme un des estuaires les plus pollués d'Europe et la Tamar présente une contamination industrielle et minière ancienne (Tronczynski *et al.*, 1999; Mighanetara *et al.*, 2009 ; Hagger *et al.*; (2008)).

I. Principaux apports dans la compréhension des mécanismes

A. Intégration des résultats

Table 4: Tableau présentant les principaux marqueurs observés comme dérégulés à la fois par approche protéomique globale et sans *a priori* et par une approche ciblant des marqueurs spécifiques.

	Contamination expérimentale		Approche environnementale	
	protéomique	autre	protéomique	autre
Métabolisme énergétique	ENO*, NDPK, MDH (2 spots), β -globine	CCO (pas d'effet)	MDH (TS), FBPA (TS), ENO (T), β -globin(TS)*	CCO(S), IC(TS)*
Système immunitaire		TNF-R, lysozyme*	C3,	TNF-R(TS), C3(S), phagocytose(S)*
Stress oxydant	GST, GPx, CAT (2 spots)	COMET	GST rho class (TS)	
Détoxification	GST	CYP1A	GST rho class (TS)	CYP1A (pas d'effet)
Métabolisme de la méthionine	SHMT (2 spots), BHMT	BHMT		BHMT (S)
Autre	HSC70,		VMO-I (S)	

Sauf précision les marqueurs cités sont plus forts en lien avec la contamination ; TS dans la Tamar et la Seine, S : dans la Seine *plus faible en lien avec la contamination;

Les résultats obtenus montrent une dérégulation de 6 grandes voies connues pour être impactées par la contamination chimique.

Une augmentation de l'accumulation de protéines de la glycolyse et du cycle de Krebs pourrait traduire une réponse à une augmentation de la demande en énergie. Ces résultats s'accompagnent d'une augmentation de l'activité de la cytochrome C oxydase (enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale) dans les muscles des poissons de la Seine alors que cet effet n'est pas observé dans les muscles des poissons contaminés expérimentalement. De même, l'indice de condition (IC) mesuré par l'indice de Fulton (CF) est plus faible chez les individus de la Seine et de la Tamar alors qu'aucune différence d'indice de condition n'apparaît chez les poissons contaminés expérimentalement. Il est possible que les conditions de laboratoire, en absence de prédation et avec une alimentation en granulés permettent aux poissons de mieux compenser cette augmentation de la demande énergétique que dans le milieu naturel.

Les effets des polluants sur le système immunitaire ont été étudiés de façon ciblée. En effet, une dépression du système immunitaire peut traduire une vulnérabilité des individus aux pathogènes. Des impacts des polluants sur le système immunitaire peuvent donc compromettre la survie des individus (Hall *et al.*, 21992 ; Zelikoff *et al.*, 2000 ; Danion *et al.*, 2012). Dans cette thèse, une augmentation, dans le foie, de l'expression gènes codant pour le TNF-R et le C3 ont été observés aussi bien en conditions expérimentales que dans la Seine et la Tamar. Le TNF-R est le récepteur du TNF- α qui est impliqué l'inflammation, l'apoptose, la nécrose et l'homeostasie des lymphocytes (Smith *et al.*, 1994 ; Wiens et Glenney, 2011). Le C3 est le complexe central des voies d'activation du système du complément (Rehana et kini, 2008) et est impliqué dans la modulation de la phagocytose, la lyse des cellules et la réponse inflammatoire (Qi *et al.*, 2011 ; Ye *et al.*, 2011 ; Boshra *et al.*, 2006) ;. Au contraire, l'activité du lysozyme, enzyme impliquée dans la réponse immunitaire innée et dans la protection contre les agents microbiens (Lie *et al.*, 1989), est diminuée après contamination expérimentale. De même, l'activité de phagocytose des macrophages est plus faible chez les poissons de la Seine que chez ceux de la Canche (cette donnée n'a pas été mesurée chez les poissons de la Tamar). Par ailleurs, l'étude protéomique n'a pas révélé de dérégulation du système immunitaire. Seule l'alpha-enolase, dont la fonction principale est glycolytique, pourrait avoir un rôle immunitaire. Des anticorps anti alpha-enolase ont été détectés dans des

maladies infectieuses ou auto-immunes. Ils pourraient jouer un rôle dans la limitation de l'invasion microbienne ou dans l'activation de la voie classique du complément (Terrier *et al.*, 2007)

Le test COMET a montré des dommages à l'ADN plus importants après exposition expérimentale aux contaminants. Ces dommages peuvent être liés à une augmentation du stress oxydant (Marabini *et al.*, 2011). Pourtant, une accumulation plus importante des enzymes anti-oxydantes GPx, CAT et GST dans le foie a été observée chez les poissons contaminés. Ainsi, la mise en place de ces défenses anti-oxydantes pourrait ne pas suffire à compenser les espèces pro-oxydantes. D'autre part, une augmentation de l'accumulation de ces enzymes pourrait ne pas traduire une augmentation de leur activité et donc des défenses réelles.

Par ailleurs, la GST a également un rôle dans les mécanismes de phase II de détoxification. Elle catalyse en effet la conjugaison du GSH aux xénobiotiques. De même, l'expression du gène codant pour le CYP1A est plus forte dans les foies des poissons contaminés expérimentalement par la dose la plus forte de cocktail. Cette enzyme est impliquée dans les mécanismes de détoxification de phase 1 et est induite en réponse à la contamination chimique par des HAP et PCB, notamment par l'intermédiaire du récepteur AhR (Goksoyr et Larsen, 1991 ; Lewis *et al.*, 2006). Ce récepteur est considéré comme un pivot dans l'induction des effets observés en réponse aux xénobiotiques et pourrait également être impliqué dans les effets immunotoxiques observés (Puga *et al.*, 2009; Esser *et al.*, 2009).

En outre, l'étude globale par 2-DE a mis en évidence l'accumulation de la BHMT et de la SHMT dans le foie des poissons en réponse à la contamination. Compte tenu du rôle des autres protéines observées comme accumulées dans les mêmes conditions (GPx, GST), l'hypothèse a été formulée de l'implication de ces protéines dans un cycles aboutissant à la production de GSH nécessaire à la détoxification ou aux défenses anti-oxydante. Cette observation montre l'intérêt d'études sans *a priori* pour la compréhension des mécanismes de réponses aux xénobiotiques. Des études antérieures de l'équipe ont également montré une dérégulation de la transcription de cette enzyme suite à un stress chimique chez le flet. Marchand *et al.* (2006) ont observé par SSH une augmentation de la transcription du gène codant la BHMT après 30 jours de contamination par des herbicides. Au contraire, Evrard *et al.* (2010) ont observé une diminution de la transcription de ce gène après 15 jours de contamination d'un cocktail de pesticides (glyphosate/AMPA) et 62 jours de contamination

d'un autre cocktail (glyphosate/AMPA/mecoprop/acetochlor/2,4D). Ainsi, l'expression du gène codant la BHMT a été mesurée dans cette thèse. Il apparaît que la transcription de ce gène est également induite après 30 jours de contamination expérimentale par la plus forte dose de HAP/PCB mais aussi après décontamination ou dans la Seine en conditions environnementales. L'étude de la transcription de la BHMT pourrait donc être plus sensible que l'étude de l'accumulation des protéines.

Enfin, l'accumulation de HSC70, protéine impliquée dans la réponse générale au stress et à la contamination chimique (Pyza et al., 1997) a été observée par 2-DE dans les foies de poissons contaminés expérimentalement.

De même, l'accumulation de VMO-I a été observée dans les foies des poissons de la Seine par 2-DE. Cette protéine est impliquée dans la vitellogenèse (Kido et Doi, 1988) et pourrait traduire une perturbation du système endocrinien chez ces poissons.

En conclusion, cette étude a mis en évidence l'implication de voies classiques impliquées dans la réponse aux xénobiotiques et dont la validité comme biomarqueurs a déjà été largement étudiée comme le métabolisme énergétique, les défenses anti-oxydantes, le système immunitaire ou la détoxification. Par ailleurs, cette étude a également montré l'implication du métabolisme de la méthionine dans la réponse à la pollution.

Ainsi, les résultats observés montrent une convergence entre les niveaux d'intégration mais des nuances peuvent apparaître. De même, les résultats observés en conditions expérimentales permettent d'expliquer une partie de ceux observés en conditions environnementales mais des modulations apparaissent.

La dérégulation de certaines protéines n'a pas été observée par 2-DE alors que la transcription du gène (C3, TNF-R, CYP1A) était dérégulée. De même, la transcription du gène codant le CYP1A et l'accumulation de BHMT et SHMT n'ont été observés qu'en condition expérimentales alors que, au contraire, les indices de conditions, l'activité de la CCO, et la VMO-I n'est modifiée qu'en conditions expérimentales. L'accumulation de β -globine est quand a elle plus forte suite à 29 jours de contamination par la dose la plus forte du cocktail HAP/PCB alors qu'elle est plus faible dans la Seine et la Tamar en conditions environnementales.

Ainsi, les résultats obtenus soulèvent 4 questions :

- Comment expliquer les différences observées entre les réponses à chaque niveau d'intégration ?
- Comment compléter et approfondir ces résultats pour mieux comprendre les mécanismes de réponse aux xénobiotiques ?
- Comment expliquer les différences observées entre les contaminations expérimentales et environnementales ?
- Les résultats obtenus, notamment par 2-DE, permettent-ils de proposer de nouveaux biomarqueurs ?

1. Du gène à l'organisme

Si les résultats montrent des convergences à chaque niveau d'intégration des nuances peuvent apparaître.

Tout d'abord, les mesures effectuées au cours de cette thèse à différents niveaux l'ont été fait sur des organes différents. La mise au point conduite au chapitre 2 a montré que leur fonctionnement peut être très différent en conditions normales. Le potentiel de chaque organe dans l'étude des réponses aux contraintes environnementales est donc différent. Ainsi, si aucune protéine impliquée dans la réponse immunitaire n'a été dérégulée dans le foie, il pourrait être envisagé de conduire des approches 2-DE sur d'autres organes comme le mucus ou le rein pour lesquels des marqueurs immunitaires sont couramment décrits (Booth et Bilodeau-Bourgeois, 2009; Rajan *et al.*, 2011; Cha *et al.*, 2012).

Par ailleurs, l'accumulation des protéines ne peut être totalement expliquée par la transcription des gènes. D'autres mécanismes interviennent comme, par exemple, les mécanismes de dégradation des protéines. De plus, l'accumulation à elle seule n'explique pas totalement l'activité d'une protéine. Celle-ci peut également être régulée par les modifications post-traductionnelles ou la présence de cofacteurs, d'agonistes ou d'antagonistes. De plus, pour une voie métabolique donnée, certaines protéines sont considérées comme des clefs de régulation.

Par ailleurs, l'électrophorèse en 2 dimensions présente des limites techniques et, s'il s'agit d'une méthode globale, elle n'est cependant pas exhaustive et la dérégulation de certaines protéines peut ne pas avoir été détectée. Les protéines peuvent également ne pas avoir été identifiées. L'électrophorèse à 2 dimensions conventionnelle utilisée dans cette étude a permis de mettre en évidence la dérégulation de certaines voies physiologiques connues comme pivots de la réponse aux xénobiotiques. Elle a aussi permis de révéler l'induction de voies peu étudiées et dont le potentiel comme biomarqueur n'a pas encore été évalué. Cependant, elle a montré quelques limites.

Tout d'abord la protéomique comparative et quantitative repose sur la comparaison de l'intensité de spots colorés dans différentes conditions. La détection des spots dépend de la quantité de protéine présente et de la sensibilité de la méthode de coloration. Ainsi, l'électrophorèse en 2 dimensions est décrite comme un iceberg pour lequel seule une petite quantité de protéines, abondantes, seraient visibles, quand au contraire une grande quantité de protéines faiblement abondantes seraient masquées (Rabilloud *et al.*, 2010; Meyer et Stuhler, 2007). Ce problème est particulièrement manifeste sur le muscle chez le flet mais aussi dans d'autres espèces (Abbaraju *et al.*, 2012 ; Bosworth *et al.*, 2005 ; McLean *et al.*, 2007). Face au même type de problème, de nombreuses études protéomiques sur du sérum, dans lequel l'abondance d'albumine et d'IgG peuvent masquer des protéines relativement faiblement abondantes, utilisent des colonnes d'immunoprécipitation afin de retirer de l'échantillon ces protéines hautement abondantes. De cette façon, l'adaptation de cette technique pour retirer des échantillons la créatine kinase, majoritaire dans le muscle, permettrait de détecter des protéines plus faiblement abondantes et d'avoir une analyse plus fine des impacts des contraintes environnementales sur le protéome du muscle.

Certaines méthodes de colorations comme le nitrate d'argent ou le bleu de Coomassie présentent une gamme de linéarité restreinte (Monteoliva et Albar, 2004) alors que l'utilisation de méthodes fluorimétriques (SyproRuby© après migration ou DIGE avant migration) dont la linéarité est plus étendue mais qui sont aussi plus sensibles permet d'améliorer la quantification des protéines. L'identification de spots dérégulés repose sur des tests statistiques dont la fiabilité dépend du nombre d'échantillons. Les contraintes techniques de l'électrophorèse en 2 dimensions impliquent généralement des échantillons de taille très réduites. Dans ce cadre, des tests statistiques inspirés de ceux utilisés en analyse de données issues de puces à ADN sont de plus en plus utilisés (Dowd, 2012 ; Monsinjon et Knigge, 2007) . Par ailleurs, si les traitements statistiques et leur validité permettent d'attester de la

dérégulation d'une protéine dans une condition, l'expérience acquise au cours de cette thèse montre que cela ne dispense pas d'une analyse visuelle des gels. En effet, alors qu'un test statistique compare des valeurs moyennes, certaines protéines peuvent être absolument absentes de certains gels et fortement présentes sur d'autres. Cette variabilité peut traduire une différence inter-individuelle liée au sexe, par exemple, que nous ne savons pas déterminer chez des juvéniles de flets. Par ailleurs, l'utilisation de la 2D-DIGE permet, outre d'améliorer la sensibilité de détection et la linéarité de la quantification, de limiter la variabilité inter-gels. En effet, contrairement à l'électrophorèse 2D conventionnelle, les échantillons sont marqués ici avant séparation à l'aide de fluorophores (Cy2, Cy3, Cy5). Ainsi, sur chaque gel, migrent parallèlement trois échantillons : deux échantillons de conditions différentes et un pool représentatifs des conditions de l'étude. Le pool permet ensuite un alignement des gels facilitant l'analyse statistique. Par ailleurs, des méthodes sans électrophorèse 2D comme l'iTRAQ ou l'ICAT permettant une très bonne quantification se développent de plus en plus mais sont limitées par la disponibilité et le coût du matériel nécessaire. Elles reposent sur un marquage isotopique des échantillons après la digestion de l'ensemble des protéines. Les marqueurs utilisés dans chaque condition présentent la même masse (isobarique) et la spectrométrie de masse permet de quantifier l'intensité de chaque peptide pour chaque condition et ainsi d'identifier les peptides présents de façon différentielle dans chaque condition (Martyniuk *et al.*, 2011).

Par ailleurs, au cours de notre étude, seule une partie des protéines dérégulées ont pu être identifiées. En effet, le génome du flet n'est pas entièrement connu et annoté et l'identification des protéines par spectrométrie de masse implique de séquencer *de novo* ces protéines et de les identifier par analogie de séquence avec d'autres espèces. Les taux d'identification obtenus dans cette thèse (autour de 50%) sont cohérents, en regard des taux communément obtenus dans des contextes similaires pour d'autres espèces marines non modèles (Forne *et al.*, 2011 ; Dowd, 2012). Plusieurs biais découlent de ce problème. Comme la part des protéines qui vont être identifiées avec succès est liée à la richesse des bases de données, les voies métaboliques identifiées sont souvent déjà connues et très étudiées comme le métabolisme énergétique ou encore les défenses anti-oxydantes. Ainsi, les capacités d'identification limitent le potentiel de découverte de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles voies impliquées dans la réponse aux xénobiotiques. Cependant, des progrès dans les taux d'identification pourraient permettre de découvrir des mécanismes originaux. En effet, le fait qu'ils ne soient pas reconnus dans les bases de données peut signifier qu'il s'agit de protéines

très variables au cours de l'évolution et dont les séquences diffèrent beaucoup entre espèces, ou bien même de protéines originales peu étudiées. Les progrès faits dans l'implémentation des bases de données comme en spectrométrie de masse pourraient permettre de meilleurs taux d'identification. Ainsi, suite aux projets de séquençage qui ont eu lieu sur la morue *Gadus morhua*, des taux d'identification de 90% sont aujourd'hui obtenus chez cette espèce (Karlsen *et al.*, 2011),

Ensuite, des protéines pourtant connues comme étant impliquées dans la réponse aux xénobiotiques n'ont pas été identifiées comme dérégulées dans cette étude, ce qui peut être lié à des limites techniques de l'électrophorèse en 2 dimensions. En effet, si cette technique donne une image globale du protéome d'un organe ou d'un tissu, il n'en donne pas une vue exhaustive mais une vue limitée par les tampons d'extraction et de solubilisation des protéines ou encore les gammes de pI et de masses utilisées pour la séparation (Rabilloud *et al.*, 2002 ; 2010) . Par exemple, les métallothionéines sont absentes de notre étude bien que la Tamar présente des taux de contamination métallique importants. En effet, ces protéines possèdent une masse inférieure à 10 kDa alors que les plus petites protéines identifiées sur nos gels (gradient 10-15% d'acrylamide) ont des masses d'environ 14 kDa. Pour pallier à cette limite, c'est-à-dire observer les protéines sur une large gamme de masse et de pI sans nuire à la résolution et la séparation des spots sur le gel, il est possible de fractionner la séparation et de conduire l'étude sur plusieurs gammes de pI (pH 3-10, pH 4-7, pH 6-11 ou très réduites pH 6.2-7.5 ou 5.3-6.5) ou de masses en parallèle. Par ailleurs, l'électrophorèse 2D conventionnelle est connue pour n'étudier que la fraction soluble des protéines ce qui exclut les protéines membranaires comme les systèmes MXR ou le cytochrome P450. Cependant, des approches en électrophorèse en 1D utilisant un pourcentage plus élevé de détergent peuvent permettre d'identifier ces protéines. Par ailleurs, des protocoles d'extractions ciblés sur les protéines membranaires sont également parfois utilisés (Molloy *et al.*, 2005; Rabilloud *et al.*, 2010). De même, un préfractionnement cellulaire peut permettre de cibler l'étude sur une partie seulement des protéines de la cellule comme les protéines membranaires ou péroxisomales (Tomanek, 2010). Ainsi, des études conduites sur les glandes salivaires de moule (*Mytilus edulis*) se limitent aux fractions microsomales (Apraiz *et al.*, 2006 ; Amelina *et al.*, 2007). D'autres méthodes de préfractionnement (colonnes d'affinités...) permettent de cibler les modifications post-traductionnelles (PTM) comme les protéines phosphorylées et ainsi étudier le phosphoprotéome des organismes (Mann et Jensen, 2003). En effet, les modifications post-traductionnelles, et notamment les phosphorylations, régulent l'activité de

protéines et notamment les signaux de transduction. L'étude des PTM est l'objet de toute une branche de la protéomique. L'électrophorèse en deux dimensions en elle-même peut permettre de les appréhender lorsqu'elles entraînent un décalage de masse ou de pI, ou bien peut être suivie d'une révélation (après western blot) avec des anticorps spécifiques d'une PTM (Rabilloud *et al.*, 2010). Les glutathionylations sont par exemple étudiées comme la conséquence du stress oxydant et les ubiquitinations pour la régulation de la dégradation des protéines (Tomanek, 2010).

L'étude des modifications post traductionnelles est particulièrement importante car elle donne des informations relatives à l'activité des protéines et donc plus proches des effets physiologiques. En effet, l'électrophorèse 2D conventionnelle donne une image de l'accumulation des protéines, sans préjuger de leur activité. Une meilleure compréhension des mécanismes implique de connaître les mécanismes responsables de cette accumulation (synthèse/dégradation). Les études protéomiques sont donc complémentaires des approches transcriptomiques mesurant l'expression de gènes. L'expression d'un gène est conditionnée par le bagage génétique des individus et les approches de génétique quantitative sont également complémentaires. Des approches par PTL (protein trait locus) ont ainsi été proposées sur le modèle des QTL (quantitative trait locus) afin de mesurer la variabilité phénotypique entre des populations (Vasemägi et Primmer, 2005). De telles approches, combinées à des approches de génétiques quantitatives sur des marqueurs neutres (Diz *et al.*, 2012 ; Karr, 2008) pourraient permettre d'expliquer l'origine des différences observées entre populations : adaptation et différenciation génétique ou acclimatation ?

Par ailleurs, l'électrophorèse en 2 dimensions est une méthode coûteuse et très chronophage. Elle est donc très difficile à appliquer en routine. Après identification de protéines dérégulées par cette méthode globale, il peut être intéressant de développer des méthodes ELISA ou western blot ciblant directement ces protéines. Ces méthodes, moins coûteuses et plus rapides, sont plus faciles à mettre en œuvre dans des études impliquant un grand nombre d'échantillons par groupe expérimental et de multiples conditions. Ces méthodes quantitatives peuvent par exemple permettre d'établir des courbes doses-réponses, très importantes en écotoxicologie. L'électrophorèse en deux dimensions ne permet de mesurer que l'accumulation des protéines. Or cette accumulation ne permet pas forcément de prédire l'activité de la protéine. Ainsi, il pourrait être intéressant de développer des méthodes de mesure d'activité enzymatique pour la BHMT. Par ailleurs, des études mécanistiques ciblées sur les différentes voies métaboliques identifiées par électrophorèse en deux

dimensions pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes de ces voies et les conséquences de leur dérégulation sur l'organisme. De plus, des mesures de paramètres phénotypiques doivent compléter les mesures de paramètres moléculaires afin de comprendre les impacts sur l'organisme, et potentiellement sur les populations et la dynamique de l'écosystème.

2. Du laboratoire au terrain

Entre l'approche expérimentale, au cours de laquelle les juvéniles de flets européen ont été contaminés par un cocktail de HAP/PCB, et les observations environnementales, des convergences dans la réponse apparaissent. En effet, les mêmes voies physiologiques semblent être impactées. Cependant, des divergences apparaissent dans les marqueurs impliqués. En effet, aucune différence n'est observée entre les sites d'étude (Seine, Canche, Tamar) dans l'expression du CYP1A, alors que celle-ci augmente après 29 jours de contamination par la dose la plus élevée de contaminant. Par ailleurs, si dans les 2 cas le métabolisme de la méthionine et notamment la BHMT semblent être dérégulés, cette réponse ne peut être observée qu'au niveau de l'expression du gène codant la BHMT en conditions environnementales, alors qu'elle est également observable par l'accumulation de SHMT et BHMT au niveau protéique après 29 jours de contamination expérimentale par la dose la plus forte de cocktail. Cependant, on peut noter qu'en conditions expérimentales, la dérégulation de la BHMT en expression de gènes reste significative après décontamination. Ainsi, il semblerait que, pour ce marqueur, la mesure de l'expression du gène permette de détecter une dérégulation de façon plus précoce et à plus faible dose que la mesure de l'accumulation des protéines. Enfin, l'accumulation de VMO-I n'apparaît dans la Seine qu'en conditions environnementales. Cette protéine, liée à la vitellogenèse, pourrait être liée à la présence de perturbateurs endocriniens dans la Seine, polluants qui ne sont pas présents dans le cocktail utilisé en conditions expérimentales.

Ainsi, bien que le plan expérimental mis en place lors de l'étude en conditions expérimentales ait été fait pour se rapprocher des conditions environnementales, de nombreux paramètres diffèrent et peuvent expliquer que les résultats de laboratoire ne sont pas identiques à ceux obtenus en conditions environnementales.

Tout d'abord, les effets observés en conditions expérimentales sont observés à court terme (29 jours) et souvent avec la dose la plus élevée de cocktail. Le fait que les réponses convergent montre que ce type d'étude expérimentale apporte des informations sur les

mécanismes de réponse mais les différences de dose et de durée d'exposition peuvent aussi contribuer à expliquer les différences observées.

Par ailleurs, le cocktail de HAP/PCB utilisé a été réalisé pour refléter les doses trouvées dans la Seine et 10 fois cette dose, et administré par l'alimentation afin de se rapprocher des conditions environnementales et d'observer les effets en tenant compte d'éventuels effets synergiques. Cependant, la composition de ce cocktail n'est pas exhaustive des polluants retrouvés dans l'environnement et ne comporte notamment pas de métaux ou de perturbateurs endocriniens. De plus, les effets des polluants peuvent être influencés par d'autres paramètres physico-chimiques du milieu comme la température, la teneur en oxygène ou la salinité. L'accumulation de ces contraintes pour les organismes peut aboutir à des phénomènes de tolérance. Certains marqueurs de stress peuvent alors ne plus être dérégulés malgré l'application d'un nouveau stress. Ce phénomène a été décrit par exemple pour l'HSP70 (Eckwert *et al.*, 1997; Pyza *et al.*, 1997).

De plus, en conditions environnementales, les individus sont soumis à différentes contraintes dont, souvent, la contamination chimique qui peut s'accumuler dans les sédiments. Une sélection dès les plus jeunes stades (œufs, larves) peut avoir lieu et seuls les individus capables de résister ou de s'acclimater se développent et survivent. C'est chez ces individus, devenus juvéniles, qu'on mesure les biomarqueurs en conditions environnementales. En conditions expérimentales, les poissons d'élevage n'ont pas subi ce type de contraintes, et n'ont donc pas été sélectionnés ni n'ont développé de tolérance ou de résistance. De même, les réponses observées dans cette thèse en études ciblées peuvent différer entre les cohortes de poissons 0+ ou 1+ ce qui pourrait être expliqué par l'acclimatation acquise par les 1+ au cours de leur première année. Par ailleurs, certains dommages comme les dommages génotoxiques, notamment liés à la contamination chimique, peuvent se transmettre de génération en génération. En conditions environnementales, l'histoire de vie des parents peut donc influencer les capacités de réponse des générations suivantes.

Par ailleurs, des phénomènes d'adaptation locale de population à des contraintes précises ont déjà été décrits. Ces phénomènes d'adaptation sont particulièrement importants à connaître dans le cadre d'une utilisation de biomarqueur. En effet, Wirgin *et al.* (2011) ont montré chez le poulamon ou petit poisson des chenaux *Microgadus tomcod* une adaptation génétique sur le gène codant pour le AhR ; Les poissons porteurs de cette mutation ne présentent pas d'induction du CYP450 en présence de pollution. Ainsi, un suivi par

biomarqueur qui se ferait exclusivement par mesure EROD serait biaisé, et le risque serait de conclure à tort à une absence de pollution. De même, chez la nucelle *Nucella lapillus* dont les femelles développent l'imposex suite à l'exposition au TBT, une forme de résistance, le syndrome de Dumpton, a été décrite (Quintela *et al.*, 2002 ; Gibbs, 2005). Les individus porteurs de cette résistance ne développent pas de pénis, même soumis au TBT. Or, le suivi de la pollution par le TBT sur les côtes européennes se fait par la mesure du développement de pénis chez ces femelles (mesure du vas deferens index, VDSI). La présence de cette forme de résistance invalide l'utilisation du VDSI comme biomarqueur pour le suivi de la pollution. Dans notre étude, alors qu'une accumulation plus importante de β -globine a été observée dans les foies de poissons traités avec la dose la plus forte de cocktail contaminant, la réponse inverse a été observée dans les foies des poissons de la Tamar et de la seine. Or, Larsen *et al.* (2007, 2008) ont observé chez le flet européen des différences interspécifiques dans la régulation de l'hématopoïèse en réponse à des différences de salinité. Leurs résultats suggèrent qu'en fonction de leur origine et leur histoire de vie, les poissons répondent de façon différente à cette nouvelle contrainte notamment aux niveaux de la synthèse de l'hémoglobine. Ainsi, les résultats divergents entre les contaminations expérimentales observés sur des poissons d'élevage et environnementales observés sur des poissons vivant en milieu naturel pourraient traduire l'existence d'une tolérance locale à la contamination chimique.

En conclusion, l'approche expérimentale a permis de mettre en lumière des voies métaboliques potentiellement impliquées dans la réponse aux HAP/PCB, qui se retrouvent en conditions environnementales. Cependant, la réponse en conditions environnementales peut être influencée par de nombreux autres facteurs inhérents aux organismes comme à la complexité du milieu.

Les études en conditions contrôlées comportent le principal avantage de pouvoir attester d'une relation de cause à effet entre la contamination et les effets observés. Cependant, pour mieux comprendre les effets observés en milieu naturel et face aux interactions des contraintes entre elles, d'autres études pourraient être conduites. Peu d'études, en conditions contrôlées, ont, à ce jour, évalué les interactions des contraintes entre elles par des approches protéomiques. Les études utilisant des cocktails de polluants se développent mais à ce jour seules 2 études (Silvestre *et al.*, 2012; Dorts *et al.*, 2012) ont combiné un stress thermique à une contamination chimique chez le poisson avant étude protéomique.

Chez le flet européen, dans le cadre de l'ANR EVOLFISH conduite par Jean Laroche (LEMAR), une étude en « common garden » a été conduite au laboratoire (collaboration Ifremer Brest). Des flets juvéniles ont été pêchés dans 3 estuaires de la côte atlantique est (estuaire du Mondego au Portugal, estuaire de la Seine et de la Vilaine en France) puis ramenés au laboratoire où ils ont subi une contamination par le même cocktail de HAP/PCB que dans cette thèse (injection IP), une élévation de température (1°C/jour pendant 15 jour puis 15 jour à 25°C), ou la combinaison de ces 2 contraintes (thermique et chimique). Ce type de plan expérimental original permet à la fois de mesurer les effets de contraintes combinées mais aussi d'évaluer l'influence de l'histoire de vie des juvéniles, de leur bagage génétique comme des contraintes auxquelles ils ont déjà été exposés, sur leurs capacités de réponse à une nouvelle contrainte.

Par ailleurs, des études en mésocosme permettent de suivre avec précision tous les paramètres physico chimiques pouvant interagir entre eux et d'effectuer des études à plus long terme qu'en laboratoire, en reproduisant des conditions proches des conditions naturelles, mais contrôlées.

Enfin, afin de mieux comprendre les mécanismes de transmission entre générations de la vulnérabilité ou de la résistance à différentes contraintes, des études sur plusieurs générations sont nécessaires. Au laboratoire, une première étude sur le flet dans ce sens devrait débiter dans les mois qui viennent (thèse de Nicolas Pedron).

V. Identification de nouveaux biomarqueurs potentiels ?

A. Les critères

Six critères d'évaluation des forces et faiblesses des biomarqueurs ont été proposés (Van der Oost *et al.*, 2003) :

- fiabilité, coût, et facilité de mise en œuvre de la méthode de quantification du biomarqueur
- afin de permettre une détection précoce de l'exposition, la réponse du biomarqueur doit être sensible à l'exposition et/ou à l'effet d'un polluant
- les valeurs du biomarqueur en conditions normales doivent être connues afin de distinguer la variabilité naturelle (bruit de fond) de la réponse induite par le contaminant (signal)

- les impacts des facteurs confondants sur le biomarqueur doivent être établis, ce qui définira sa spécificité
- les mécanismes sous-jacents de la relation entre l'exposition au polluant et la réponse du biomarqueur (dose et temps de réponse) doivent être établis
- la signification toxicologique du biomarqueur, c'est-à-dire les relations entre sa réponse et les impacts à long terme sur l'organisme doivent être établies.

Par ailleurs, il est préférable que la mesure de ces biomarqueurs soit non invasive.

Les biomarqueurs au niveau moléculaire (protéomique ou transcriptomique) sont précoces et sont donc de bons candidats même si leur mesure est souvent invasive. Cependant, il est important pour chaque candidat biomarqueur d'évaluer sa spécificité ainsi que sa variabilité naturelle (influence du sexe, de la saison, du statut reproducteur, du stade de développement) de même que les relations doses-réponse et les effets à long terme sur l'organisme. Pour ce faire, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes de réponse au polluant considéré. Par ailleurs, les effets à long terme sur l'environnement doivent être évalués. Afin de mesurer les conséquences d'une dérégulation au niveau moléculaire sur l'organisme et sa capacité de survie en milieu naturel, il peut être intéressant de coupler les études mécanistiques moléculaires à des challenge testant les capacités des individus à répondre à des épreuves liées à leur survie. Par exemple, les conséquences de perturbation du métabolisme énergétique sur l'efficacité de nage et les performances physiques peuvent être testées en tunnel de nage avec mesure calorimétriques (Claireaux *et al.*, 2006). La capacité des individus à résister à un pathogène peut également montrer une altération du système immunitaire pouvant affecter la survie (Danion *et al.*, 2011).

Outre ces effets à long terme sur l'organisme, les effets toxicologiques sur l'écosystème dépendent aussi de la place de l'espèce sentinelle choisie dans la dynamique écologique. Ainsi, des effets observés sur une espèce clef auront plus d'impact sur la dynamique de l'écosystème qu'une espèce non clef.

B. Les candidats

Suite aux études protéomiques réalisées au cours de cette étude, la dérégulation du métabolisme énergétique, l'induction de mécanismes anti-oxydants et de détoxification ont été observés. Ces mécanismes ont déjà été beaucoup étudié et leur potentiel comme biomarqueur évalué. Au contraire, le potentiel comme biomarqueur de la VMO-I et des

enzymes impliquées dans le cycle de la méthionine, notamment la BHMT, ont à ce jour beaucoup moins été considérés.

1. VMO-I

La VMO-I est une protéine impliquée dans la vitellogenèse. Elle a été peu étudiée jusqu'à présent et son rôle dans la vitellogenèse, comme son implication dans la réponse à des perturbateurs endocriniens, sont mal connus. Cependant, les marqueurs comme la VTG sont généralement considérés comme spécifiques d'une perturbation endocrinienne. La VTG n'a pas été trouvée comme dérégulée dans cette étude protéomique, bien qu'elle soit produite dans le foie et que sa détection par électrophorèse en 2 dimensions ne semble pas limitée par des contraintes techniques (Ziv *et al.*, 2008). Ainsi, les protéines de la famille de la vitelline outer layer membrane protein I (VMO-I) pourraient constituer des biomarqueurs plus précoces de la présence de perturbateurs endocriniens que la VTG couramment utilisée. De plus, d'autres études ont montré que la réponse de protéines comme les ZRP ou zona pellucida proteins est plus précoce que l'induction de VTG (Arukwe *et al.*, 1997; Arukwe et goksøyr, 2003). Cependant, il est clair qu'avant une validation et une application en suivi environnemental, les mécanismes de l'induction de cette protéine, les relations doses réponse et sa spécificité devraient être étudiées. De même, les effets saisonniers, du sexe, du stade de développement, du statut reproducteur doivent être évalués.

2. BHMT

Les approches par électrophorèse 2D ont permis de mettre en évidence une dérégulation de la SHMT et de la BHMT, deux enzymes de la voie de déméthylation de la glycine bêtaïne qui est liée au cycle de la méthionine. La dérégulation de la BHMT est souvent retrouvée par des approches globales suite à contamination chimique, tant au niveau transcriptomique (Williams *et al.*, 2008; Evrard *et al.*, 2010; Marchand *et al.*, 2006; Woo et Yum, 2011) que protéomique (Kling *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2012; Sanchez *et al.*, 2009; De Wit *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Par la suite, la transcription de la BHMT a été mesurée par qPCR tant sur le terrain qu'en conditions expérimentales. Cette étude a montré que l'accumulation de BHMT est liée, au moins en partie, à une augmentation de sa transcription. Cependant, nos résultats suggèrent que les effets peuvent être observés pour des doses moins élevées et à plus long terme au niveau transcriptomique qu'au niveau protéomique. Les mécanismes d'action et le rôle de la BHMT en réponse à la contamination sont mal connus, et les approches mécanistiques pourraient permettre de mieux les comprendre. Pourtant, cette enzyme est dérégulée en réponse à de nombreuses contraintes, et conservée dans tous les taxa.

La BHMT est ainsi retrouvée notamment chez les procaryotes (Pichereau *et al.*, 1999), dans le foie et le rein des vertébrés (Pajares et Perez-Salas, 2006), ou chez les mollusques (Company *et al.*, 2011 ; Truebano *et al.*, 2010).

La BHMT semble être dérégulée sous l'effet de nombreuses contraintes, mais elle peut se retrouver réprimée comme accumulée. L'avantage des méthodes globales et d'apporter une vue d'ensemble des dérégulations. Sur cette base, plusieurs hypothèses peuvent être proposées quant au rôle de la BHMT dans la réponse à ces différentes contraintes. Ainsi, une augmentation de la BHMT est souvent associée à une dérégulation de la GST. Cette observation nous a conduits à proposer l'implication de la BHMT dans les mécanismes de détoxification de phase 2 suite à une contamination chimique. Par ailleurs, la BHMT est également dérégulée suite à d'autres contraintes comme l'hypoxie (Everett *et al.*, 2012), une variation de la température (expérimentale Podrabsky et Somero, 2004 ; Ibarz *et al.*, 2010 ou naturelle et saisonnière Richards *et al.*, 2010 ; Evrard *et al.*, 2012) comme à un stress osmotique (Diamant *et al.*, 2001) ou les hautes pressions (Yancey *et al.*, 2002). Une diminution de BHMT peut participer à une augmentation de la quantité de glycine bêtaïne, dont le rôle dans l'ajustement osmotique est très documenté (Pichereau *et al.*, 2000), mais qui est également considérée comme un chaperon chimique, et pourrait donc aussi être impliquée dans la réponse au stress thermique (Diamant *et al.*, 2001). Considérant le fait que d'autre chaperons, initialement découvertes pour leur rôle dans la réponse à une augmentation de température comme les HSP, répondent en fait également à d'autres contraintes comme la contamination chimique, il est possible que la BHMT puisse participer à la régulation de ce système de protection des macromolécules en réponse au contaminant. Enfin, la variation en BHMT est corrélée à une variation en SAM, donneur de méthyl dans de nombreuses réactions. Ainsi, un rôle de la BHMT dans la régulation des mécanismes épigénétiques a été proposé (Oliva *et al.*, 2009). D'un point de vue environnemental cette hypothèse est particulièrement importante. En effet, les mécanismes épigénétiques participent à la régulation de la transcription des gènes et peuvent être transmis à la descendance, des effets sur plusieurs générations pourraient donc être observés (Vandegheuchte et Janssen, 2011 ; Head *et al.*, 2012). Par ailleurs, la SAM est un donneur de méthyle dans la synthèse de la choline, précurseur de la glycine bêtaïne entrant également dans la composition des phospholipides (ie, phosphatidylcholine) (Pajares et Perez-Sala, 2006). Un lien entre la modulation de la BHMT et le métabolisme des lipides lors de la saison hivernale a été proposé (Richard *et al.*, 2010) chez l'éperlan arc-en-ciel *Osmerus mordax*. Cependant, aucune

protéine liée au métabolisme des lipides n'ayant été dérégulée en réponse à la contamination au cours de cette étude, il est peu probable que cette hypothèse contribue à expliquer nos résultats

En conclusion, nous émettons l'hypothèse que la BHMT puisse avoir un rôle pivot dans le compromis entre la production de GSH en réponse à une contamination chimique ou un stress oxydant. Dans une telle situation, cela induirait une déplétion en glycine bêtaïne (BHMT augmentée). A l'inverse, une diminution de la BHMT permettrait le maintien d'un pool conséquent de glycine bêtaïne, au rôle protecteur et de chaperon moléculaire. Cependant, une diminution de l'activité de la BHMT pourrait aussi entraîner une augmentation de la quantité d'homocystéine qui est cytotoxique, à moins que la méthionine-synthase ne permette de catalyser la méthylation de l'homocystéine en méthionine.

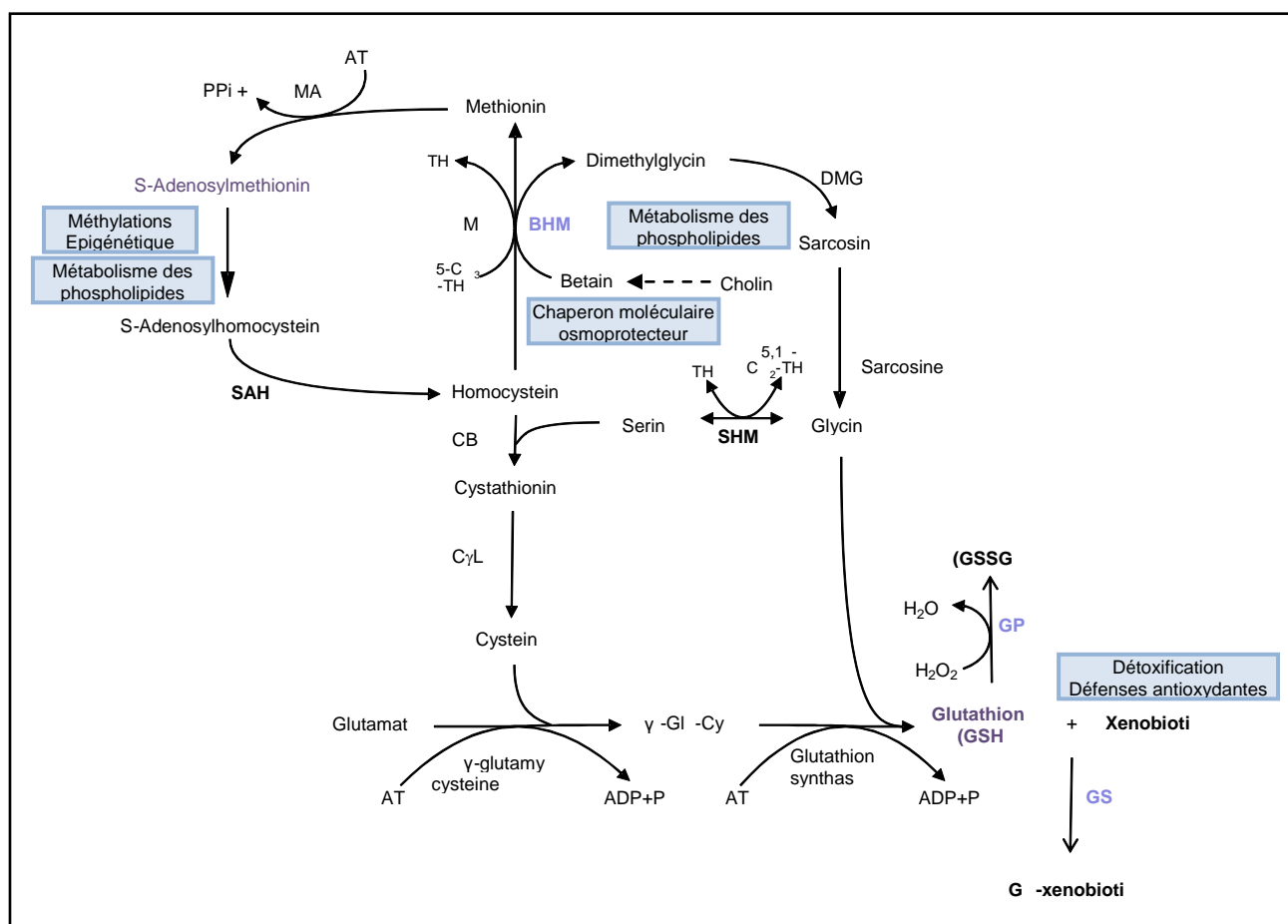


Figure 8 : Schéma des voies métaboliques au centre desquels la BHMT semble jouer un rôle pivot. CBS, cystathionine beta synthase; C_γL, cystathionine gamma lyase; MS, méthionine synthase; BHMT, bêtaïne homocystéine méthyltransférase; SHMT, sérine hydroxyméthyltransférase; GST, glutathione S transférase; GPx, glutathione peroxydase

Des études mécanistiques ciblées sur ce problème sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de la dérégulation de la BHMT. Dans ce cadre, les études sur cellules isolées sont les plus indiquées pour permettre l'utilisation d'inhibiteurs, par exemple, qui permettraient d'attester de véritables relations de cause à effet entre la présence d'un polluant et la réponse observée. Elles permettraient en effet de mettre en œuvre facilement des études doses réponse et différentes contraintes abiotiques comme la contamination chimiques (par différents contaminants, seuls ou combinés), des élévations ou diminutions de température, ou encore une hypoxie. La BHMT est connue pour être exprimée dans le foie et le rein chez les mammifères (Pajares et Perez-Salas, 2006). Cependant, le rôle physiologique de cette protéine peut être différent selon les tissus. En effet, la glycine bêtaïne est un osmoprotecteur dans le rein des mammifères (Chambers et Kunin, 1987). Ainsi, il pourrait être intéressant d'évaluer chez le poisson si l'expression de la BHMT est également présente dans le rein, et quel est alors son rôle. En effet, les mécanismes d'excretions des bases azotées par le rein sont très différents entre mammifères et les poissons, notamment en raison du rôle que jouent l'urée et l'ammoniac dans l'osmorégulation (Wright, 1995). Au cours de cette thèse, des essais ont été réalisés sur des primo-culture de pronephros (résultats non présentés). En effet, le pronephros contient de nombreux lymphocytes. Effectuer des études écotoxicologiques sur cette population cellulaire permettrait ainsi de mesurer, en plus des marqueurs moléculaires de stress oxydant, des marqueurs de détoxification et de la viabilité cellulaire, sa fonctionnalité par mesure de l'activité de phagocytose. Les premiers essais ont montré la pertinence de ce type d'approche. Malheureusement, il s'avère que la quantité de tissu disponible chez les juvéniles de flets ne nous a pas permis d'effectuer de réelles études impliquant différentes concentrations de contaminants. Compte tenu de la taille des organes d'un flet juvénile (foie ou pronephros), il pourrait être intéressant d'effectuer ce type d'approche sur d'autres espèces, ou sur des adultes pour lesquels la disponibilité en tissu est plus importante. Par ailleurs, il existe des lignées cellulaires de poisson comme les fish hepatoma cell line, PLHC-1 qui ont montré leur intérêt dans les études écotoxicologiques (Fent, 2001)

Ainsi, afin de mieux comprendre le rôle de l'induction, ou de la répression, de la BHMT en réponse à ces contraintes, il pourrait être intéressant :

- d'inhiber l'activité de la BHMT à l'aide d'inhibiteurs spécifiques comme la CBHcy (S-(d-carboxybutyl)-DL-homocysteine ; Collinsova *et al.*, 2006), ou même sa transcription par

RNAi (Ji *et al.*, 2007). Une telle inhibition est susceptible d'entraîner à la fois une augmentation du pool de glycine bêtaïne, mais aussi une augmentation d'homocystéine. Or, si la glycine bêtaïne est considérée comme un osmoprotecteur et un chaperon chimique face à de nombreuses contraintes, l'hyperhomocystéinémie est décrite comme délétère pour la cellule, et liée à des effets tels que la stéatose hépatique (« foie gras »), par exemple (Pajares et Perez-Salas, 2006). Les effets cellulaires pourraient donc résulter du compromis entre le bénéfice d'une accumulation en glycine-bêtaïne, et les effets délétères d'une accumulation d'homocystéine.

-d'inhiber la choline oxydase, enzyme catalysant la conversion de la choline en glycine bêtaïne, par le DMAE (diméthylamino éthanol), par exemple (Lohr & Acara, 1990). Une telle inhibition pourrait entraîner une diminution de la quantité de glycine bêtaïne et permettrait d'évaluer l'importance de son rôle comme protecteur moléculaire contre des contraintes abiotiques. Un ajout ultérieur de glycine bêtaïne pourrait permettre de déterminer si une augmentation de glycine bêtaïne entraîne une récupération des dommages ou s'ils sont irréversibles.

- beaucoup des molécules participant à ce cycle sont apportées par l'alimentation (méthionine, choline). De même, de nombreux cofacteurs sont nécessaires au fonctionnement de ce cycle comme les vitamines B12 et B6 ou des métaux comme le zinc. Ces différents éléments peuvent être des régulateurs de l'activité des protéines. Ainsi, il pourrait être intéressant d'évaluer la réponse à différents stress abiotiques en présence d'excès ou de quantités limitées de ces différents cofacteurs. De même, les effets d'une supplémentation de méthionine et/ou de choline pourrait être envisagé, afin d'évaluer si l'excès de ces molécules exerce ou non un contrôle sur l'expression ou l'activité de BHMT.

- le promoteur du gène codant la BHMT semble être régulé par les hormones stéroïdes et notamment le cortisol, hormone impliquée dans la réponse générale au stress (Hontela, 1998; Pajares et Perez-Sala, 2006). Ainsi, il pourrait être intéressant d'ajouter expérimentalement du cortisol aux cultures cellulaires afin de voir si les effets observés suite à une augmentation de cortisol sont comparables à ceux observés suite aux différents stress expérimentaux.

Dans ce cadre, plusieurs paramètres pourraient être mesurés tout d'abord, la viabilité des cellules. Ensuite, afin de tester les différentes hypothèses proposées quant au rôle d'une induction (ou répression) de la BHMT en réponse à un stress abiotique, il pourrait être intéressant de mesurer :

Les dommages oxydatifs (péroxydations lipidiques, dommages à l'ADN) ainsi que la transcription et l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la SOD, la CAT et la GPx. L'expression de la GST ainsi que son activité, pourraient également être mesurée, autant pour le rôle que joue cette protéine dans les défenses anti-oxydantes que pour son rôle dans la détoxification. Dans ce cadre-là, il pourrait également être intéressant de mesurer la quantité de GSH accumulée. La mesure de l'activité EROD, ou de l'induction de CYP1A pourrait également être mesurée afin de détecter une éventuelle corrélation entre les différentes enzymes de détoxification. Par ailleurs, si l'hypothèse d'une relation de cause à effet entre la production de GSH et l'induction de BHMT est confirmée, il pourrait être intéressant, afin d'étudier les mécanismes de régulation de ce système, de supplémenter les cellules en GSH et/ou en cystéine et/ou en glycine afin de voir si un excès en ces molécules exerce un quelconque contrôle sur la transcription et/ou sur l'activité de la BHMT. Par ailleurs, les concentrations en triglycérides, cholestérol et l'expression de différentes apolipoprotéines pourraient également être mesurées afin de tester l'hypothèse d'une implication de ce cycle dans ces voies métaboliques. La SAM pouvant également être impliquée dans les mécanismes épigénétiques de méthylation des histones et de l'ADN, ces différents paramètres pourraient être mesurés. Par ailleurs, l'activité de la BHMT peut être mesurée. Une approche métabolomique par RMN permet de quantifier les métabolites (glycine bêtaïne, méthionine, homocystéine...) et ainsi de suivre l'activité de la BHMT (Lee, 2006). Enfin, il pourrait également être intéressant de compléter ces mesures ciblées par des approches globales et notamment protéomiques afin d'avoir une vue d'ensemble de la dérégulation du système et des autres voies impliquées.

Dans le cadre de telles études mécanistiques, et notamment dans un objectif de validation de biomarqueur, il serait en outre très important de mener des études doses réponses. En effet, la balance entre induction et répression de la BHMT pourrait être liée à la nature des contraintes, mais aussi à leur durée et à leur intensité.

C. Assumer le manque de spécificité : évaluer l'adéquation entre milieu et organisme

En conclusion, des études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes de ces différentes voies et éventuellement pouvoir les utiliser en tant que biomarqueurs. Malgré tout, il apparaît d'ores et déjà que, la protéine VMO-I mise à part, ces voies ne sont pas spécifiques de la pollution et encore moins d'un type de polluant précis. La spécificité est considérée comme un critère de validation d'un bon biomarqueur, et est considérée comme le facteur

limitant pour de nombreux marqueurs notamment moléculaire (van der Oost *et al.*, 2003). Par exemple, les mécanismes du stress oxydant sont induits sous l'effet de la contamination chimique, de l'hypoxie, d'une élévation de température... et contribuent à expliquer, notamment par l'intermédiaire de la génotoxicité et de l'induction de l'apoptose, des effets tant sur le système immunitaire que neurotoxiques, par exemple (van der Oost *et al.*, 2003). Il en est de même pour l'implication de nombreuses voies de signalisation comme les voies impliquant des phosphorylations ou encore les voies Ca^{2+} dépendantes.

Cependant, si la spécificité peut être un atout pour le suivi d'un polluant dont la présence a déjà été identifiée dans l'écosystème considéré, suite à des actions de remédiation par exemple, l'utilisation de marqueurs non spécifiques d'un polluants mais relevant d'une réponse générale au stress peuvent se révéler très utiles.

En effet ces marqueurs permettent d'évaluer l'adéquation entre les conditions environnementales et la physiologie des organismes. Ainsi, en première intention, dans le cadre de la mise en place du suivi d'un écosystème ils permettent de répondre à la question : les individus de l'espèce sentinelle étudiée subissent-ils une contrainte à laquelle ils doivent s'acclimater ? Par la suite, si la réponse est positive, d'autres mesures de biomarqueurs plus spécifiques, dont des méthodes de dosages chimiques ou des mesures directes de paramètres physico-chimiques, peuvent permettre de cerner la contrainte incriminée.

Des biomarqueurs non spécifiques permettant cette approche sans *a priori* de la présence d'un contaminant en particulier pourraient être la BHMT ou le stress oxydant. D'autre part, le développement d'approches multi biomarqueurs permet de palier à la fois au manque de spécificité stricte des marqueurs et en même temps d'utiliser plusieurs marqueurs afin de garder la possibilité de détecter la dérégulation de différents marqueurs et donc de détecter des stress très différents.

Dans ce cadre, les approches globales pourraient être utilisées en suivi de la qualité environnementale comme un moyen d'avoir en une seule expérience, l'induction de différents marqueur sans *a priori*, qu'ils soient généraux de la réponse au stress (stress oxydant, BHMT, métabolisme énergétique) ou plus spécifiques (VTG, VMO-I).

Ces approches pourraient également être conduite par d'autres méthodes globales comme les puces à ADN ou en combinant ses approches dans le cadre d'une démarche systémique. Une fois encore, le développement de bases de données est nécessaire pour conduire ce type

d'approches. La base ctd (comparative toxicogenomics database, <http://ctdbase.org/>) permet de retrouver les interactions connues entre l'expression d'un gène donné et une contamination chimique. A titre d'exemple, une recherche effectuée sur le gène de la BHMT donne 85 interactions, montrant que l'expression de ce gène peut être dérégulée par un ensemble de composés organiques (benzo(a)pyrene, bromobenzene...) comme inorganiques (cadmium, chlorure de mercure...). Cette recherche pourrait être effectuée sur les autres gènes dérégulés, et un profil de contamination, qui constitue une sorte de signature de la contrainte subie par l'organisme, dressé à partir des convergences des interactions pour chacun des gènes (ou protéines).

Cependant cette approche présente des limites. Tout d'abord, elle est limitée par le contenu de la base de données. Ensuite, cette base ne contient à l'heure actuelle que très peu de données sur la dérégulation des protéines, mais est riche en données sur la dérégulation des ARNm. Or, les effets à ces deux niveaux d'intégration peuvent être différents. Par ailleurs, de nombreuses mises au point sont nécessaires avant d'entreprendre une telle approche dans le suivi d'un écosystème. Il est tout d'abord nécessaire de connaître le protéome ou le transcriptome de l'espèce sentinelle considérée dans un état témoin non perturbé. Par ailleurs, la mise en place technique des approches globales, tant protéomiques que transcriptomiques, est très coûteuse, demande un matériel sophistiqué et du personnel formé à ces techniques. Il paraît donc difficile à l'heure actuelle d'envisager leur utilisation en routine ou dans des bureaux d'étude.

D. Conclusion

Les biomarqueurs ont montré leur intérêt dans le suivi de la qualité des écosystèmes. Cependant, il est très difficile de trouver un biomarqueur idéal. L'approche biomarqueur pourrait être conçue comme complémentaire d'autres approches, par dosage chimique notamment. A l'heure actuelle, de nombreux biomarqueurs peuvent être utilisés mais il existe un manque de standardisation des méthodes de suivi. En s'inspirant des protocoles utilisés dans les contrôles bactériologiques agroalimentaires, un protocole combinant des biomarqueurs non spécifiques avec des biomarqueurs spécifiques, combinés à des mesures chimiques ciblées choisies en fonction de la probabilité de rencontrer un contaminant spécifique, pourraient être mises en place. L'approche non spécifique permettrait de détecter la présence d'un stress sans l'identifier. L'approche spécifique, choisie en fonction des probabilités de rencontrer un contaminant en particulier, permettrait de suivre l'évolution de la présence de ce contaminant dans le milieu.

Références bibliographiques

2000. Directive 2000/60/CE du parlement européen et du conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau Journal officiel des Communautés européennes.
- Abarnou, A. & J. Duchemin, 2008. Distribution et devenir de contaminants persistants dans les écosystèmes littoraux. Comparaison Manche ouest-Manche est Rapport final etude AESN-IFREMER.
- Akcha, F., F. Vincent Hubert & A. Pfohl-Leszkowicz, 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 534(1-2):21-32 doi:10.1016/s1383-5718(02)00244-9.
- Al-Arabi, S. A. M. & A. Goksoyr, 2002. Cytochrome P4501A responses in two tropical fish species, riverine catfish (*Rita rita*) and marine mudfish (*Apocryptes bato*). Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol 131(1):61-71.
- Amara, R., T. Meziane, C. Gilliers, G. Hermel & P. Laffargue, 2007. Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. Marine Ecology Progress Series 351:201-208 doi:10.3354/meps07154.
- Amara, R., J. Selleslagh, G. Billon & C. Minier, 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. Hydrobiologia 627(1):87-98.
- Amara, U., D. Rittirsch, M. Flierl, U. Bruckner, A. Klos, F. Gebhard, J. D. Lambris & M. Huber-Lang, 2008. Interaction Between the Coagulation and Complement System. In Lambris, J. D. (ed) Current Topics in Complement II. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 632. Springer US, 68-76.
- Arkoosh, M. R., E. Clemons, P. Huffman, A. N. Kagley, E. Casillas, N. Adams, H. R. Sanborn, T. K. Collier & J. E. Stein, 2001. Increased Susceptibility of Juvenile Chinook Salmon to Vibriosis after Exposure to Chlorinated and Aromatic Compounds Found in Contaminated Urban Estuaries. J Aquat Anim Health 13(3):257-268 doi:10.1577/1548-8667(2001)013<0257:isojcs>2.0.co;2.
- Bado-Nilles, A., C. Quentel, D. Mazurais, J. L. Zambonino-Infante, M. Auffret, H. Thomas-Guyon & S. Le Floch, 2011. In vivo effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné). Ecotox Environ Safe 74(7):1896-1904 doi:10.1016/j.ecoenv.2011.06.021.
- Bado-Nilles, A., C. Quentel, H. Thomas-Guyon & S. Le Floch, 2009. Effects of two oils and 16 pure polycyclic aromatic hydrocarbons on plasmatic immune parameters in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linne). Toxicol Vitro 23(2):235-241 doi:10.1016/j.tiv.2008.12.001.
- Bayne, C. J., L. Gerwick, K. Fujiki, M. Nakao & T. Yano, 2001. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. Developmental & Comparative Immunology 25(3):205-217 doi:10.1016/s0145-305x(00)00057-4.
- Beck, M., K. Heck Jr, K. Able, D. Childers, D. Eggleston, B. Gillanders, B. Halpern, C. Hays, K. Hoshino & T. Minello, 2001. The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. BioScience 51(8):633-641.
- Blaise, C., F. Gagne, J. Pellerin, P. D. Hansen & S. Trottier, 2002. Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. Environ Toxicol 17(3):170-186 doi:10.1002/tox.10048.
- Bols, N. C., J. L. Brubacher, R. C. Ganassin & L. E. J. Lee, 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Dev Comp Immunol 25(8-9):853-873.

- Boshra, H., J. Li & J. O. Sunyer, 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* 20(2):239-262 doi:10.1016/j.fsi.2005.04.004.
- Bravo, C. F., 2005. Assessing mechanisms of immunotoxicity for polycyclic aromatic hydrocarbons in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Oregon State university.
- Bravo, C. F., L. R. Curtis, M. S. Myers, J. P. Meador, L. L. Johnson, J. Buzitis, T. K. Collier, J. D. Morrow, C. A. Laetz, F. J. Loge & M. R. Arkoosh, 2011. BIOMARKER RESPONSES AND DISEASE SUSCEPTIBILITY IN JUVENILE RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS MYKISS* FED A HIGH MOLECULAR WEIGHT PAH MIXTURE. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(3):704-714 doi:10.1002/etc.439.
- Brousseau, P., Y. Payette, H. Tryphonas, B. Blakley, H. Boermans, D. Flipo & M. Fournier, 1999. Manual of immunological methods. CRC Press, Boston, USA.
- Cabon, J. Y., L. Burel, C. Jaffrennou, P. Giamarchi & F. Bautin, 2007. Study of trace metal leaching from coals into seawater. *Chemosphere* 69(7):1100-1110 doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.018.
- Cachot, J., Y. Cherel, T. Larcher, A. Pfohl-Leszkowics, J. Laroche, L. Quiniou, J. Morin, J. Schmitz, T. Burgeot & D. Pottier, 2012. Histopathological lesions and DNA adducts in the liver of European flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Seine estuary versus two reference estuarine systems on the French Atlantic coast. *Environ Sci Pollut Res* (In press) doi:10.1007/s11356-012-1287-0.
- Cachot, J., O. Geffard, S. Augagneur, S. Lacroix, K. Le Menach, L. Peluhet, J. Couteau, X. Denier, M. H. Devier, D. Pottier & H. Budzinski, 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat Toxicol* 79(3):257-267.
- Calvès, I., 2011. Effets du réchauffement climatique, de l'hypoxie et de la contamination chimique sur les réponses évolutives de populations de flet (*Platichthys flesus*). Université de Bretagne Occidentale.
- Carlson, E. A., Y. Li & J. T. Zelikoff, 2004. Benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression. *Toxicol Appl Pharmacol* 201(1):40-52 doi:10.1016/j.taap.2004.04.018.
- Celander, M. C., 2011. Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquat Toxicol* 105(3-4, Supplement):72-77 doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.002.
- Cohen, A., M. Gagnon & D. Nugegoda, 2005. Alterations of Metabolic Enzymes in Australian Bass, *Macquaria novemaculeata*, After Exposure to Petroleum Hydrocarbons. *Arch Environ Contam Toxicol* 49(2):200-205 doi:10.1007/s00244-004-0174-1.
- Cohen, A., D. Nugegoda & M. M. Gagnon, 2001. Metabolic Responses of Fish Following Exposure to Two Different Oil Spill Remediation Techniques. *Ecotox Environ Safe* 48(3):306-310 doi:10.1006/eesa.2000.2020.
- Costa, P. M., J. Lobo, S. Caeiro, M. Martins, A. M. Ferreira, M. Caetano, C. Vale, T. Á. DelValls & M. H. Costa, 2008. Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 654(1):29-37 doi:10.1016/j.mrgentox.2008.04.007.
- Courrat, A., J. Lobry, D. Nicolas, P. Laffargue, R. Amara, M. Lepage, M. Girardin & O. Le Pape, 2009. Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 81(2):179-190.
- Couture, P., J. W. Rajotte & G. G. Pyle, 2008. Seasonal and Regional Variations in Metal Contamination and Condition Indicators in Yellow Perch (*Perca flavescens*) along

- Two Polymetallic Gradients. III. Energetic and Physiological Indicators. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 14(1):146-165 doi:10.1080/10807030701790314.
- Cowley, P. D. & A. K. Whitfield, 2002. Biomass and production estimates of a fish community in a small South African estuary. J Fish Biol 61:74-89 doi:10.1111/j.1095-8649.2002.tb01763.x.
- Danion, M., S. Le Floch, J. Castric, F. Lamour, J. Cabon & C. Quentel, 2012. Effect of chronic exposure to pendimethalin on the susceptibility of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* L., to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). Ecotox Environ Safe 79(0):28-34 doi:10.1016/j.ecoenv.2012.01.018.
- Danion, M., S. Le Floch, R. Kanan, F. Lamour & C. Quentel, 2011. Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Aquat Toxicol 105(3-4):300-311 doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.022.
- Dautremepuits, C., S. Betoulle, S. Paris-Palacios & G. Vernet, 2004. Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp (Cestoda). Aquat Toxicol 68(4):325-338 doi:10.1016/j.aquatox.2004.04.003.
- Devaux, A., P. Flammarion, V. Bernardon, J. Garric & G. Monod, 1998. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). Mar Environ Res 46(1-5):257-262 doi:10.1016/s0141-1136(97)00105-0.
- Dolbeth, M., F. Martinho, I. Viegas, H. Cabral & M. A. Pardal, 2008. Estuarine production of resident and nursery fish species: Conditioning by drought events? Estuarine, Coastal and Shelf Science 78(1):51-60 doi:10.1016/j.ecss.2007.11.021.
- Doyotte, A., C. L. Mitchelmore, D. Ronisz, J. McEvoy, D. R. Livingstone & L. D. Peters, 2001. Hepatic 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity in eel (*Anguilla anguilla*) from the Thames Estuary and comparisons with other United Kingdom estuaries. Mar Pollut Bull 42(12):1313-1322.
- Dunier, M. & A. K. Siwicki, 1993. effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish - a review. Fish & Shellfish Immunology 3(6):423-438.
- Dupuy, C., C. Galland, A. Devaux, S. Bony, V. Loizeau, M. Danione, M. Auffret, M. Fournier & J. Laroche, in submission. Responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to a mixture of PAHs and PCBs in experimental conditions.
- Dutil, J.-D., Y. Lambert & D. Chabot, 2003. Winter and spring changes in condition factor and energy reserves of wild cod compared with changes observed during food-deprivation in the laboratory. ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil 60(4):780-786 doi:10.1016/s1054-3139(03)00024-9.
- Eggens, M. L., A. D. Vethaak, M. J. Leaver, G. Horbach, J. P. Boon & W. Seinen, 1996. Differences in CYP1A response between flounder (*Platichthys flesus*) and plaice (*Pleuronectes platessa*) after long-term exposure to harbour dredged spoil in a mesocosm study. Chemosphere 32(7):1357-1380.
- Evrard, E., A. Devaux, S. Bony, T. Burgeot, R. Riso, H. Budzinski, M. Du, L. Quiniou & J. Laroche, 2010a. Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. Biomarkers 15(2):111-127.
- Evrard, E., A. Devaux, S. Bony, J. Cachot, G. Charrier, L. Quiniou & J. Laroche, 2012. Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multistress in the

- Vilaine estuary, during a 6-month survey. *Environ Sci Pollut Res*:1-14 doi:10.1007/s11356-012-1138-z.
- Evrard, E., J. Marchand, M. Theron, K. Pichavant-Rafini, G. Durand, L. Quiniou & J. Laroche, 2010b. Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 152(3):321-331 doi:10.1016/j.cbpc.2010.05.009.
- Flammarion, P., A. Devaux, S. Nehls, B. Migeon, P. Noury & J. Garric, 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotox Environ Safe* 51(2):145-153 doi:10.1006/eesa.2001.2134.
- Florin, A.-B., G. Sundblad & U. Bergström, 2009. Characterisation of juvenile flatfish habitats in the Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 82(2):294-300 doi:10.1016/j.ecss.2009.01.012.
- Fonseca, V. F., C. Vinagre & H. N. Cabral, 2006. Growth variability of juvenile soles *Solea solea* and *Solea senegalensis*, and comparison with RNA : DNA ratios in the Tagus estuary, Portugal. *J Fish Biol* 68(5):1551-1562 doi:10.1111/j.0022-1112.2006.001042.x.
- Fournier, M., D. Cyr, B. Blakley, H. Boermans & P. Brousseau, 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist* 40(3):412.
- Frenzilli, G., M. Nigro & B. P. Lyons, 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681(1):80-92 doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.001.
- Froese, R., 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology* 22(4):241-253 doi:10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x.
- Gagnon, M. M., 2002. Metabolic disturbances in fish exposed to sodium pentachlorophenate (NaPCP) and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126), individually or combined. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 132(4):425-435 doi:10.1016/s1532-0456(02)00091-1.
- Gagnon, M. M. & D. A. Holdway, 1999. Metabolic Enzyme Activities in Fish Gills as Biomarkers of Exposure to Petroleum Hydrocarbons. *Ecotox Environ Safe* 44(1):92-99 doi:10.1006/eesa.1999.1804.
- Galland, C., C. Dupuy, C. Capitaine, M. Auffret, L. Quiniou, J. Laroche & V. Pichereau, 2012. Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *Journal of Sea Research* doi:10.1016/j.seares.2012.05.009.
- Garceau, N., N. Pichaud & P. Couture, 2010. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquat Toxicol* 98(2):107-112 doi:10.1016/j.aquatox.2010.01.020.
- Gilliers, C., R. Amara & J.-P. Bergeron, 2004. Comparison of growth and condition indices of juvenile flatfish in different coastal nursery grounds. *Environ Biol Fishes* 71(2):189-198 doi:10.1007/s10641-004-0090-2.
- Goksoyr, A. & H. E. Larsen, 1991. The cytochrome-P450 system of atlantic salmon (*Salmo salar*) .1. Basal properties and induction of P450-1A1 in liver of immature and mature fish. *Fish Physiol Biochem* 9(4):339-349.
- Guimaraes, L., C. Gravato, J. Santos, L. S. Monteiro & L. Guilhermino, 2009. Yellow eel (*Anguilla anguilla*) development in NW Portuguese estuaries with different contamination levels. *Ecotoxicology* 18(4):385-402 doi:10.1007/s10646-008-0294-x.

- Hagger, J. A., M. B. Jones, D. Lowe, D. R. P. Leonard, R. Owen & T. S. Galloway, 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. *Mar Pollut Bull* 56(6):1111-1118 doi:10.1016/j.marpolbul.2008.03.040.
- Holth, T. F., A. Thorsen, P. A. Olsvik & K. Hylland, 2010. Long-term exposure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to components of produced water: condition, gonad maturation, and gene expression. *Can J Fish Aquat Sci* 67(10):1685-1698 doi:doi:10.1139/F10-089.
- Houde, E. & E. Rutherford, 1993. Recent trends in estuarine fisheries: Predictions of fish production and yield. *Estuaries* 16(2):161-176 doi:10.2307/1352488.
- Jaouen-Madoulet, A., A. Abarnou, A. M. Le Guellec, V. Loizeau & F. Leboulenger, 2000. Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. *J Chromatogr A* 886(1-2):153-173 doi:10.1016/S0021-9673(00)00422-2.
- Jha, A. N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23(3):207-221 doi:10.1093/mutage/gen014.
- Johnson, L. L., J. T. Landahl, L. A. Kubin, B. H. Horness, M. S. Myers, T. K. Collier & J. E. Stein, 1998. Assessing the effects of anthropogenic stressors on Puget Sound flatfish populations. *Journal of Sea Research* 39(1-2):125-137.
- Kerr, J. L., Z. Guo, D. W. Smith, G. G. Goss & M. Belosevic, 2008. Use of goldfish to monitor wastewater and reuse water for xenobiotics. *Journal of Environmental Engineering and Science* 7(4):369-383 doi:doi:10.1139/S08-011.
- Kirby, M. F., A. J. Smith, J. Rooke, P. Neall, A. P. Scott & I. Katsiadaki, 2007. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquatic toxicology* 81(3):233-244.
- Kleinjans, J. C. S. & F. J. van Schooten, 2002. Ecogenotoxicology: the evolving field. *Environ Toxicol Pharmacol* 11(3-4):173-179.
- Lambert, Y. & J.-D. Dutil, 1997. Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of cod (*Gadus morhua*)? *Can J Fish Aquat Sci* 54(S1):104-112 doi:doi:10.1139/f96-149.
- Lambert, Y., J.-D. Dutil & J. Munro, 1994. Effects of Intermediate and Low Salinity Conditions on Growth Rate and Food Conversion of Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Can J Fish Aquat Sci* 51(7):1569-1576 doi:doi:10.1139/f94-155.
- Lamberth, S. J. & J. K. Turpie, 2003. The Role of Estuaries in South African Fisheries: Economic Importance and Management Implications. *African Journal of Marine Science* 25(1):131-157 doi:10.2989/18142320309504005.
- Langston, W., B. Chesman, G. Burt, S. Hawkins, J. Readman & P. Worsfold, 2003. Characterisation of the South West European Marine Sites : Plymouth Sound and Estuaries cSAC, SPA. Occasional Publications. *Mar Biol Assoc Occ Pub* 9:202p.
- Laroche, J., O. Gauthier, L. Quiniou, A. Devaux, S. Bony, E. Evrard, J. Cachot, Y. Chérel, T. Larcher, R. Riso, V. Pichereau, M. Devier & H. Budzinski, 2012. Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environ Sci Pollut Res* doi:10.1007/s11356-012-1276-3.
- Law, R. J., V. J. Dawes, R. J. Woodhead & P. Matthiessen, 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in seawater around England and Wales. *Mar Pollut Bull* 34(5):306-322.
- Leaver, M. J., A. Diab, E. Boukouvala, T. D. Williams, J. K. Chipman, C. F. Moffat, C. D. Robinson & S. G. George, 2010. Hepatic gene expression in flounder chronically

- exposed to multiply polluted estuarine sediment: Absence of classical exposure 'biomarker' signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways. *Aquat Toxicol* 96(3):234-245.
- Lee, R. F. & S. Steinert, 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res-Rev Mutat Res* 544(1):43-64 doi:10.1016/s1383-5742(03)00017-6.
- Lewis, N. A., T. D. Williams & J. K. Chipman, 2006. Functional analysis of a metal response element in the regulatory region of flounder cytochrome P450 1A and implications for environmental monitoring of pollutants. *Toxicol Sci* 92(2):387-393 doi:10.1093/toxsci/kfl023.
- Lie, O., O. Evensen, A. Sorensen & E. Froysadal, 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis Aquat Org* 6(1):1-5.
- Loizeau, V. & A. Abarnou, 1995. Niveaux de contamination par les PCB dans le réseau trophique du bar et du flet. Rapport scientifique Seine Aval, Thème Edifices Biologiques, 85–120.
- Marchand, J., L. Quiniou, R. Riso, M.-T. Thebaut & J. Laroche, 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat Toxicol* 70(4):327-343 doi:10.1016/j.aquatox.2004.10.001.
- Marchand, J., A. Tanguy, G. Charrier, L. Quiniou, E. Plee-Gauthier & J. Laroche, 2006. Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the european flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure. *Mar Biotechnol* 8(3):275-294 doi:10.1007/s10126-005-0099-3.
- Minier, C., F. Levy, D. Rabel, G. Bocquené, D. Godefroy, T. Burgeot & F. Leboulenger, 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Mar Environ Res* 50(1-5):373-377.
- Munsch, C., K. Moisan, I. Truquet & J. Tronczynski, 1996. Caractérisation chimique de la contamination organique dans l'estuaire de la Seine Rapport Seine-Aval 1996/FIN-3 Agence de l'Eau Seine-Normandie, France, 41-60.
- Nikinmaa, M. & K. T. Rytkönen, 2011. Functional genomics in aquatic toxicology - Do not forget the function. *Aquat Toxicol* 105:16-24.
- Pacheco, M. & M. A. Santos, 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotox Environ Safe* 53(3):331-347 doi:10.1016/s0147-6513(02)00017-9.
- Park, C.-I., T. Kurobe, I. Hirono & T. Aoki, 2003. Cloning and characterization of cDNAs for two distinct tumor necrosis factor receptor superfamily genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Developmental & Comparative Immunology* 27(5):365-375 doi:10.1016/s0145-305x(02)00118-0.
- Parry, R. M., R. C. Chandan & K. M. Shahani, 1965. A Rapid and Sensitive Assay of Muramidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 119(2):384-386 doi:10.3181/00379727-119-30188.
- Pelletier, D., J. D. Dutil, P. Blier & H. Guderley, 1994. Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 164(3):179-190 doi:10.1007/bf00354078.
- Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9):e45 doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- Qi, Z.-H., Y.-F. Liu, W.-N. Wang, X. Wu, Y. Xin, Y.-F. Lu & A.-L. Wang, 2011. Molecular characterization and functional analysis of a complement C3 molecule in the orange-

- spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Fish & Shellfish Immunology 31(6):1284-1290 doi:10.1016/j.fsi.2011.09.018.
- Ramos, S., P. Ré & A. A. Bordalo, 2009. Environmental control on early life stages of flatfishes in the Lima Estuary (NW Portugal). Estuarine, Coastal and Shelf Science 83(2):252-264 doi:10.1016/j.ecss.2009.03.031.
- Rehana, S. & R. M. Kini, 2008. Complement C3 isoforms in *Austrelaps superbis*. Toxicon 51(5):864-881 doi:10.1016/j.toxicon.2007.12.020.
- Reynaud, S. & P. Deschaux, 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. Aquat Toxicol 77(2):229-238 doi:10.1016/j.aquatox.2005.10.018.
- Reynaud, S., D. Marriónet, L. Taysse & P. Deschaux, 2005. Interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha modulate cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). Ecotox Environ Safe 62(3):355-362 doi:10.1016/j.ecoenv.2004.12.013.
- Reynaud, S., M. Raveton & P. Ravanel, 2008. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review. Aquat Toxicol 87(3):139-145 doi:10.1016/j.aquatox.2008.01.013.
- Reynolds, W. J., S. W. Feist, G. J. Jones, B. P. Lyons, D. A. Sheahan & G. D. Stentiford, 2003. Comparison of biomarker and pathological responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) induced by ingested polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination. Chemosphere 52(7):1135-1145 doi:10.1016/s0045-6535(03)00332-1.
- Roy, L. A., S. Steinert, S. M. Bay, D. Greenstein, Y. Sapozhnikova, O. Bawardi, I. Leifer & D. Schlenk, 2003. Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA. Aquat Toxicol 65(2):159-169 doi:10.1016/s0166-445x(03)00135-8.
- Rozen, S. & H. Skaletsky, 1999. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers , Bioinformatics Methods and Protocols. In Misener, S. & S. A. Krawetz (eds). Methods in Molecular Biology, vol 132. Humana Press, 365-386.
- Salomon, S., P. Giamarchi & A. Le Bihan, 2000. Desirability approach for optimisation of electrothermal atomic absorption spectrometry factors in iron determinations. Analisis 28(7):575-586.
- Sanchez-Dardon, J., I. Voccia, A. Hontela, S. Chilmonczyk, M. Dunier, H. Boermans, B. Blakley & M. Fournier, 1999. Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo. Environ Toxicol Chem 18(7):1492-1497.
- Sarasquete, C. & H. Segner, 2000. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. The Science of The Total Environment 247(2-3):313-332.
- Saurabh, S. & P. Sahoo, 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquac Res 39(3):223-239.
- Schantz, M., R. Parris, J. Kurz, K. Ballschmiter & S. Wise, 1993. Comparison of methods for the gas-chromatographic determination of PCB congeners and chlorinated pesticides in marine reference materials. Fresenius J Anal Chem 346(6-9):766-778 doi:10.1007/bf00321288.
- Schleizinger, J. J., W. D. J. Struntz, J. V. Goldstone & J. J. Stegeman, 2006. Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by coplanar polychlorinated biphenyl congeners. Aquat Toxicol 77(4):422-432 doi:10.1016/j.aquatox.2006.01.012.
- Sheir, S. K. & R. D. Handy, 2010. Tissue Injury and Cellular Immune Responses to Cadmium Chloride Exposure in the Common Mussel *Mytilus edulis*: Modulation by

- Lipopolysaccharide. Arch Environ Contam Toxicol 59(4):602-613 doi:10.1007/s00244-010-9502-9.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice & E. L. Schneider, 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175(1):184-191 doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0.
- Skerritt, D., 2010. A review of the European flounder *Platichthys flesus*-Biology, Life History and Trends in Population International Marine & Environmental Consultancy MSc. Newcastle University.
- Skouras, A., K. Broeg, H. Dizer, H. von Westernhagen, P. D. Hansen & D. Steinhagen, 2003. The use of innate immune responses as biomarkers in a programme of integrated biological effects monitoring on flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea. Helgoland Mar Res 57(3-4):190-198 doi:10.1007/s10152-003-0141-7.
- Smith, C. A., T. Farrah & R. G. Goodwin, 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. Cell 76(6):959-962 doi:10.1016/0092-8674(94)90372-7.
- Smith, L. & H. Conrad, 1956. A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome c by cytochrome c oxidase. Arch Biochem Biophys 63(2):403-413 doi:10.1016/0003-9861(56)90055-8.
- Stevens, M., J. Maes & F. Ollevier, 2006. A spatially-explicit bioenergetics model of habitat quality for flounder *Platichthys flesus* in the Scheldt estuary Intertidal and basin-wide habitat use of fishes in the Scheldt estuary. 93.
- Straub, P. F., M. L. Higham, A. Tanguy, B. J. Landau, W. C. Phoel, L. S. Hales & T. K. M. Thwing, 2004. Suppression subtractive hybridization cDNA libraries to identify differentially expressed genes from contrasting fish habitats. Mar Biotechnol 6(4):386-399 doi:10.1007/s10126-004-3146-6.
- Talbot, C., 1993. Some aspects of the biology of feeding and growth in fish. Proc Nutr Soc 52(3):403-16.
- Teles, M., S. Mackenzie, S. Boltana, A. Callol & L. Tort, 2011. Gene expression and TNF- α secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide. Fish & Shellfish Immunology 30(1):340-346 doi:10.1016/j.fsi.2010.11.006.
- Théron, M., F. Guerrero & P. Sebert, 2000. Improvement in the efficiency of oxidative phosphorylation in the freshwater eel acclimated to 10.1 MPa hydrostatic pressure. Journal of Experimental Biology 203(19):3019-3023.
- Tsiftoglou, A. S., A. I. Tsamadou & L. C. Papadopoulou, 2006. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. Pharmacology & Therapeutics 111(2):327-345 doi:10.1016/j.pharmthera.2005.10.017.
- van der Oost, R., J. Beyer & N. P. E. Vermeulen, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol 13(2):57-149.
- Vethaak, A. D., J. G. Jol & C. Martínez-Gómez, 2011. Effects of cumulative stress on fish health near freshwater outlet sluices into the sea: A case study (1988–2005) with evidence for a contributing role of chemical contaminants. Integrated Environmental Assessment and Management 7(3):445-458 doi:10.1002/ieam.163.
- Viarengo, A., E. Bettella, R. Fabbri, B. Burlando & M. Lafaurie, 1997. Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metal effects. Mar Environ Res 44(1):1-11 doi:10.1016/s0141-1136(96)00097-9.
- Wang, P.-H., D.-H. Wan, L.-R. Pang, Z.-H. Gu, W. Qiu, S.-P. Weng, X.-Q. Yu & J.-G. He, 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of the tumor

- necrosis factor (TNF) superfamily gene, TNF receptor superfamily gene and lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) gene from *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology* 36(1):39-50 doi:10.1016/j.dci.2011.06.002.
- Watts, M., B. L. Munday & C. M. Burke, 2001. Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal* 79(8):570-574 doi:10.1111/j.1751-0813.2001.tb10753.x.
- Wessel, N., R. Santos, D. Menard, K. Le Menach, V. Buchet, N. Lebayon, V. Loizeau, T. Burgeot, H. Budzinski & F. Akcha, 2010. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Mar Environ Res* 69, Supplement 1(0):S71-S73 doi:10.1016/j.marenvres.2010.03.004.
- Wiens, G. D. & G. W. Glenney, 2011. Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. *Developmental & Comparative Immunology* 35(12):1324-1335 doi:10.1016/j.dci.2011.03.031.
- Williams, T. D., K. Gensberg, S. D. Minchin & J. K. Chipman, 2003. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). *Aquatic toxicology* 65(2):141-157 doi:10.1016/s0166-445x(03)00119-x.
- Williams, T. D., N. Turan, A. M. Diab, H. Wu, C. Mackenzie, K. L. Bartie, O. Hrydziusko, B. P. Lyons, G. D. Stentiford, J. M. Herbert, J. K. Abraham, I. Katsiadaki, M. J. Leaver, J. B. Taggart, S. G. George, M. R. Viant, K. J. Chipman & F. Falciani, 2011. Towards a System Level Understanding of Non-Model Organisms Sampled from the Environment: A Network Biology Approach. *PLoS Comput Biol* 7(8):e1002126 doi:10.1371/journal.pcbi.1002126.
- Wirgin, I. & J. R. Waldman, 1998. Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. *Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen* 399(2):193-219.
- Yamashita, Y., M. Tanaka & J. M. Miller, 2001. Ecophysiology of juvenile flatfish in nursery grounds. *Journal of Sea Research* 45(3-4):205-218 doi:10.1016/s1385-1101(01)00049-1.
- Yang, D., S. G. Elner, Z.-M. Bian, G. O. Till, H. R. Petty & V. M. Elner, 2007. Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. *Experimental Eye Research* 85(4):462-472 doi:10.1016/j.exer.2007.06.013.
- Ye, R., E. Lei, M. Lam, A. Chan, J. Bo, J. van de Merwe, A. Fong, M. Yang, J. Lee, H. Segner, C. Wong, R. Wu & D. Au, 2011. Gender-specific modulation of immune system complement gene expression in marine medaka *Oryzias melastigma* following dietary exposure of BDE-47. *Environ Sci Pollut Res* 19(7):2477-2487 doi:10.1007/s11356-012-0887-z.
- Zelikoff, J. T., 1998. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? *Toxicology* 129(1):63-71.

Abstract: Response of the European flounder *Platichthys flesus* to experimental and *in situ* contamination: a proteomic approach.

Estuaries are important areas highly susceptible to anthropogenic degradations such as pollution. Estuarine species have to cope not only with environmental constraints inherent to estuarine habitats, but also with the presence of contaminants, the occurrence of hypoxic events or with waters warming. The European flounder *Platichthys flesus* is considered as a sentinel species in estuarine water quality monitoring. This study investigates the molecular mechanisms allowing the European flounder to cope with these different stress factors, both in environmental and experimental conditions, in order to eventually identify potential biomarkers of the response to contamination. A proteomic approach using 2-dimensional electrophoresis followed by MALDI TOF-TOF mass spectrometry allowed us to identify differentially expressed proteins in flounder livers, and then to better understand the mechanisms and a pathway implied in the response of flounder to environmental constraints. These observations were completed by targeted markers analyses by qPCR and enzymatic activity measurements. First, farm flounders were experimentally contaminated with two concentrations of PAH/PCB cocktails (concentrations found in the Seine and ten times this concentration). After 29 days of contamination, energetic metabolism was deregulated in contaminated flounder livers. Proteins involved in anti-oxidative defenses and detoxification were also accumulated. We suggest that BHMT could be implied in a pathway leading to the production of GSH allowing detoxification and anti-oxidative defense. Then, Flounders were fished in contrasted estuaries along the French Atlantic coast. The liver proteomic patterns of Flounders from the Seine (France) and the Tamar (UK), two estuaries displaying different contamination patterns, and from the Canche (France), were compared to characterize the proteins differentially expressed between these sites. Proteome profiles reflected the contamination patterns in each estuary.

Keywords. ecotoxicology, proteomic, *Platichthys flesus*, PAH/PCB, estuary

Résumé : Réponse du Flet européen *Platichthys flesus* à la contamination chimique : approche protéomique.

Les estuaires sont des zones de transition entre les eaux fluviales et les océans soumis à de fortes contraintes d'origine anthropique, telles que la pollution chimique. Pourtant, les estuaires sont d'une importance écologique primordiale, et sont notamment des zones de nourricerie ou de reproduction pour de nombreuses espèces. Le Flet européen *Platichthys flesus* est un modèle souvent utilisé comme espèce sentinelle dans les estuaires. Le but de ces travaux est d'explorer les mécanismes de réponse du Flet européen à la contamination chimique, afin éventuellement d'identifier de nouveaux biomarqueurs. Il a donc été choisi de mener cette étude par une approche de protéomique par électrophorèse en deux dimensions. Les protéines différenciellement accumulées en réponse à la pollution ont été identifiées par MALDI TOF-TOF. Ces études par protéomique ont été complétées par des mesures ciblées de transcription de gènes. Tout d'abord, des flets juvéniles issus d'un élevage ont été contaminés expérimentalement avec deux doses d'un cocktail de HAP et PCB (concentration retrouvée dans la Seine, et 10 fois celle-ci). Après 29 jours de contamination, le métabolisme énergétique paraît dérégulé. Des protéines impliquées dans les défenses anti-oxydantes et la détoxification sont accumulées dans le foie des poissons contaminés. Les résultats nous ont conduit à poser l'hypothèse de l'implication de la BHMT dans un cycle aboutissant à la production de GSH, et qui pourrait donc participer à la détoxification ou aux défenses anti-oxydantes. Ensuite, les profils protéiques de foies de poissons issus de 3 estuaires de la Manche ont été comparés. Les profils protéiques des foies de poissons de la Seine et de la Tamar, 2 estuaires présentant des profils de contamination différents, se sont révélés différents des profils protéiques des foies des poissons de la Canche. Des différences moins marquées entre les profils protéiques des foies de poissons de la Seine et de la Tamar pourraient refléter les différences entre les contaminants présents dans ces estuaires.

Mots clefs : ecotoxicologie, protéomique, *Platichthys flesus*, HAP/PCB, estuaire
